

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Química



Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del Grado Académico de Doctor en Tecnología Química en el campo de Polímeros.

***“Diseño y Evaluación de Nuevos Sistemas Basados en
Micropartículas Poliméricas Biodegradables para su
Aplicación a la Liberación Controlada de Progesterona”***

Lic. Carlos Alberto Busatto

Directora: Dra. Estenoz, Diana A.

Co-director: Dr. Luna, Julio A.

Grupo de Polímeros y Reactores de Polimerización

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química

INTEC (UNL-CONICET)

-2018-

Agradecimientos

El desarrollo de esta tesis se llevó a cabo con el apoyo y colaboración de muchas personas e instituciones, a las cuales quiero agradecer.

A la Dra. Diana Estenoz y al Dr. Julio Luna, por su confianza en mí y por su dirección en este tema de tesis.

A la Dra. Natalia Casis y al Dr. Ignacio Helbling, por su aporte y presencia durante el desarrollo experimental y teórico de esta tesis.

A la Dra. Valérie Ravaine, por su dirección durante mi estancia de investigación en el Institut des Sciences Moléculaires (Université de Bordeaux).

A mi familia y amigos por estar siempre presentes.

A todos los integrantes del Grupo de Polímeros y Reactores de Polimerización, por su apoyo y sus consejos. En particular a la Dra. Mariana Yossen y al Lic. Marcelo Brandolini, por su aporte en la operación de equipos.

A todos los integrantes del Laboratorio de Química Fina, por su apoyo en aspectos experimentales y teóricos. En particular a la Lic. Andrea Propielarz, por su instrucción en la operación de equipos.

A la Facultad de Ingeniería Química (UNL) por haberme aceptado como tesista para llevar a cabo mis estudios de posgrado y realizar el seguimiento académico de mi doctorado.

Al Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA, UNL) por recibirme en sus instalaciones y por la colaboración en el desarrollo de los ensayos.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) que financió mi beca doctoral.

Resumen

Se han desarrollado diversas plataformas de liberación controlada de progesterona con el objetivo de sincronizar el celo en el ganado bovino. Los sistemas basados en micropartículas poliméricas biodegradables han atraído un especial interés debido a que presentan diversas ventajas, tales como fácil preparación y administración, no requieren intervención quirúrgica para remover el material al término de la liberación, y es posible controlar los tiempos de liberación/degradación en base a las propiedades fisicoquímicas del polímero, entre otras. En el presente trabajo de tesis se estudiaron tres matrices poliméricas biodegradables para la preparación de micropartículas: PLGA, quitosano y ácido hialurónico. Las micropartículas se obtuvieron empleando diferentes técnicas de preparación y fueron caracterizadas en cuanto a propiedades fisicoquímicas, degradabilidad y perfiles de liberación. Además, se desarrollaron modelos matemáticos de degradación de la matriz polimérica y de liberación controlada de progesterona.

En el Capítulo 1 se presenta una descripción teórica de los aspectos más importantes de la problemática y de los sistemas de liberación controlada de progesterona existentes, así como también de los diferentes métodos de preparación de micropartículas empleados en el presente trabajo de tesis.

En el Capítulo 2 se formula un modelo matemático de degradación hidrolítica homogénea de microesferas de PLGA. El modelo tiene en cuenta el efecto autocatalítico de los grupos carboxílicos y la composición del copolímero sobre la velocidad de degradación del mismo. El modelo permite estimar las evoluciones de pesos moleculares medios, pérdida de masa, concentraciones de enlaces éster y perfil de pH durante el proceso de degradación, y se ajusta a partir de datos experimentales de la literatura.

En el Capítulo 3 se investiga la preparación de microesferas de PLGA por el método de evaporación/extracción de solvente y se estudia el efecto del tamaño de partícula sobre la velocidad de degradación. Además, se formula un modelo matemático para la degradación hidrolítica heterogénea de microesferas de PLGA. El modelo permite estimar las evoluciones de los pesos moleculares medios, distribuciones de pesos moleculares, pérdida de masa y cambios morfológicos de las partículas durante el proceso de degradación.

En el capítulo 4 se estudia la encapsulación de progesterona en microesferas de PLGA obtenidas por el método de evaporación/extracción de solvente y por

microfluídica. Además, se investiga el efecto del tamaño de partícula, la polidispersidad y la degradación de la matriz polimérica sobre la velocidad de liberación *in vitro* de la hormona. Por otro lado, el modelo matemático de degradación hidrolítica heterogénea se extiende a fin de poder predecir la liberación de la progesterona a partir de microesferas de PLGA. El modelo de liberación incorpora la disolución y la difusión del fármaco en función de los cambios morfológicos asociados a la degradación de la matriz polimérica.

En el Capítulo 5 se investiga la obtención de microgeles monodispersos de ácido hialurónico mediante microfluídica. El método estudiado permite la incorporación de una nanoemulsión de aceite conteniendo la droga en el interior de microgeles hidrofílicos a través de la formación de una doble emulsión aceite/agua/aceite, donde la fase acuosa se convierte posteriormente en la fase gel. Además, se emplea la degradación enzimática de los microgeles para provocar la liberación de las nanogotas de aceite cargadas con progesterona.

En el Capítulo 6 se estudia la obtención de micropartículas de quitosano entrecruzadas con TPP, empleando la técnica de secado por atomización. Se investiga el efecto de la formulación sobre las características finales de las micropartículas (tamaño, esfericidad, eficiencia de encapsulación, potencial Z), y el efecto del grado de entrecruzamiento y del pH del medio sobre los perfiles de liberación de progesterona desde las micropartículas de quitosano.

Índice general

Agradecimientos.....	1
Resumen.....	2
Índice de tablas.....	8
Índice de figuras.....	9
Abreviaturas.....	14
Capítulo 1: Introducción general.....	16
1.1 Introducción.....	17
1.2 Fases del ciclo estral bovino.....	17
1.2.a Fase Folicular o de regresión del cuerpo lúteo (proestro).....	18
1.2.b Fase Periovulatoria (estro y metaestro).....	18
1.2.c Fase Luteal (diestro).....	19
1.3 Métodos de sincronización del celo de bovinos.....	21
1.4 Sistemas intravaginales de liberación controlada de hormonas.....	22
1.5 Liberación controlada de hormonas vía parenteral.....	24
1.6 Polímeros biodegradables.....	26
1.7 Métodos para la preparación de microesferas.....	27
1.7.a Evaporación/extracción de solvente.....	27
1.7.b Emulsión aceite/agua (o/w).....	28
1.7.c Emulsión agua/aceite/agua (w/o/w).....	28
1.7.d Emulsión aceite/aceite (o/o).....	29
1.7.e Separación de fases (coacervación).....	29
1.7.f Secado por atomización.....	30
1.7.g Microfluídica.....	32
Capítulo 2: Degradación hidrolítica homogénea de microesferas de PLGA.....	36
2.1 Introducción.....	37
2.1.a Poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) y sus copolímeros.....	37
2.1.b Degradación y erosión del PLGA.....	39
2.1.c Factores que afectan la degradación de matrices de PLGA.....	41
2.1.d Modelos matemáticos para la degradación del PLGA.....	43
2.2 Experimentos simulados.....	45
2.2.a Experimentos de degradación de Blanco y col. (2006).....	45
2.2.b Experimentos de degradación de Mariano (2012).....	45

2.3 Resultados y discusión.....	46
2.3.a Experimentos de degradación de Blanco y col. (2006).....	46
2.3.b Experimentos de degradación de Mariano (2012).....	49
2.4 Modelo matemático.....	52
2.5 Resultados de las simulaciones y discusión.....	53
2.6 Conclusiones.....	58
Capítulo 3: Degradación hidrolítica heterogénea de microesferas de PLGA.....	59
3.1 Introducción.....	60
3.2 Trabajo experimental.....	62
3.2.1 Materiales.....	62
3.2.2 Preparación de las microesferas.....	62
3.2.3 Estudios de degradación.....	62
3.2.4 Caracterización.....	63
3.2.4.a Distribución de tamaño de las microesferas.....	63
3.2.4.b Pérdida de masa.....	63
3.2.4.c Determinación de los pesos moleculares.....	63
3.2.4.d Morfología mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).....	63
3.2.4.e Estudio de disolución de oligómeros.....	64
3.3 Modelo matemático.....	64
3.4 Resultados y discusión.....	67
3.5 Conclusiones.....	75
Capítulo 4: Microesferas de PLGA para la liberación controlada de progesterona.....	76
4.1 Introducción.....	77
4.2 Trabajo experimental.....	81
4.2.1 Materiales.....	81
4.2.2 Metodología.....	81
4.2.2.1 Preparación de las microesferas por el método de extracción/evaporación de solvente.....	81
4.2.2.2 Preparación de las microesferas por microfluídica.....	81
4.2.2.3 Caracterización de las micropartículas.....	83
4.2.2.3a Tamaño medio y distribución de tamaños de partícula.....	83
4.2.2.3b Caracterización térmica.....	83
4.2.2.3c Carga inicial de la droga.....	83

4.2.2.3d Ensayos de liberación <i>in vitro</i>	83
4.2.2.4 Modelo matemático de liberación controlada.....	84
4.2.2.4a Módulo de degradación.....	84
4.2.2.4b Módulo de liberación.....	84
4.2.2.4c Implementación del modelo.....	87
4.3 Resultados y discusión.....	88
4.4 Conclusiones.....	99
Capítulo 5: Microgeles de ácido hialurónico para la liberación controlada de progesterona.....	100
5.1 Introducción.....	101
5.1.a Microgeles en liberación controlada de drogas.....	101
5.1.b Ácido hialurónico.....	102
5.2 Trabajo experimental.....	104
5.2.1 Materiales.....	104
5.2.2 Metodología.....	104
5.2.2.a Síntesis de ácido hialurónico metacrilado (AH-MA).....	104
5.2.2.b Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (¹ H-RMN).....	105
5.2.2.c Preparación y caracterización de la emulsión primaria.....	105
5.2.2.d Preparación de los microgeles de AH-MA.....	105
5.2.2.e Estudios de degradación enzimática con hialuronidasas.....	107
5.2.2.f Encapsulación y liberación de progesterona.....	108
5.3 Resultados y discusión.....	109
5.3.a Caracterización del macrómero de AH-MA.....	109
5.3.b Preparación de los microgeles por microfluídica.....	109
5.3.c Estudios de degradación enzimática con hialuronidasas.....	115
5.3.d Aplicación de los microgeles a la encapsulación y liberación controlada de progesterona.....	116
5.4 Conclusiones.....	119
Capítulo 6: Micropartículas de quitosano entrecruzadas con TPP para la liberación controlada de progesterona.....	120
6.1 Introducción.....	121
6.1.a Quitosano.....	121
6.1.b Micropartículas de quitosano aplicadas a la liberación controlada de drogas.....	122
6.2 Trabajo experimental.....	124

6.2.1 Materiales.....	124
6.2.2 Metodología.....	124
6.2.2.1 Determinación de la solubilidad de la progesterona en soluciones de quitosano.....	124
6.2.2.2 Caracterización del quitosano.....	124
6.2.2.2.a Determinación del grado de desacetilación del quitosano...	124
6.2.2.2.b Pesos moleculares.....	125
6.2.2.3 Preparación de las micropartículas de quitosano.....	125
6.2.2.4 Caracterización de las micropartículas.....	126
6.2.2.4.a Morfología de las partículas.....	126
6.2.2.4.b Determinación del tamaño de partícula.....	126
6.2.2.4.c Mediciones de potencial Z.....	127
6.2.2.4.d Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.....	127
6.2.2.4.e Calorimetría de barrido diferencial (DSC).....	127
6.2.2.4.f Eficiencia de la encapsulación.....	127
6.2.2.4.g Ensayos de liberación <i>in vitro</i>	128
6.2.2.4.h Cuantificación de progesterona mediante HPLC.....	128
6.2.2.5 Análisis teórico.....	129
6.3 Resultados y discusión.....	132
6.4 Conclusiones.....	148
Conclusiones finales y perspectivas futuras.....	150
Bibliografía.....	154
Apéndices.....	171
Apéndice A: Modelo matemático de la degradación hidrolítica homogénea de microesferas de PLGA.....	172
Apéndice B: Modelo matemático de la degradación hidrolítica heterogénea de microesferas de PLGA.....	175

Índice de tablas

Tabla 2.1: Degradación de microesferas de PLA y PLGA (Blanco y col., 2006).....	46
Tabla 2.2: Datos experimentales de la degradación de microesferas de PLGA.....	49
Tabla 2.3: Constantes cinéticas de los Exps. 1-4.....	54
Tabla 3.1. Constantes cinéticas y parámetros de transporte.....	71
Tabla 4.1. Condiciones experimentales y características de las micropartículas de PLGA.....	89
Tabla 4.2. Datos de entrada, constantes cinéticas y parámetros de transporte del modelo.....	97
Tabla 6.1. Efecto de los factores de formulación sobre el tamaño de partícula y el grado de esfericidad.....	135

Índice de figuras

Figura 1.1: Nivel relativo de hormonas durante el ciclo estral bovino.....	20
Figura 1.2: Tecnologías disponibles en el mercado para la administración de fármacos intravaginales usados en animales de granja. A = esponjas; B = CueMate; C = CIDR-B; D = CIDR 1380; E = EMIDD; F = Smartt1; G = PRID; H = CIDR; I = IBD; J = PCL (Rathbone, 2012).....	23
Figura 1.3: Estructura química de polímeros biodegradables naturales y sintéticos..	26
Figura 1.4: Esquema de la preparación de microesferas mediante las técnicas de extracción/evaporación de solvente, coacervación y secado por atomización.....	32
Figura 1.5: Geometrías utilizadas en dispositivos de microfluídica: a) “T-junction”; b) “flow focusing”; y c) “co-flow”.....	34
Figura 2.1: Estructuras químicas del poli(ácido glicólico) (PGA), del poli(ácido láctico) (PLA) y del poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA).....	37
Figura 2.2: Síntesis de PGA, PLA y PLGA por polimerización por apertura de anillo.....	38
Figura 2.3: Visualización esquemática del proceso de degradación: a) <i>bulk</i> y b) superficial.....	40
Figura 2.4: Perfiles de degradación <i>in vivo</i> de PLGA.....	41
Figura 2.5: a), b) Evolución de los pesos moleculares medios (\overline{M}_n y \overline{M}_w) para los Exps. 1-3; y c) Evolución de las concentraciones de enlaces éster para los Exps. 1-3. (Datos experimentales en símbolos y resultados de simulación en líneas continuas)....	47
Figura 2.6: Evolución de la pérdida de masa para los Exps. 1-3. (Datos experimentales en símbolos y resultados de simulación en líneas continuas).....	48
Figura 2.7. Micrografía electrónica de barrido de las microesferas de PLGA.....	49
Figura 2.8: a) Evolución de los pesos moleculares medios (\overline{M}_n y \overline{M}_w) para el Exp. 4; y b) Evolución de la concentración de enlaces éster para el Exp. 4. (Datos experimentales en símbolos y resultados de simulación en líneas continuas).....	50
Figura 2.9: a) Evolución de la pérdida de masa para el Exp. 4; y b) Evolución del pH para el Exp. 4. (Datos experimentales en símbolos y resultados de simulación en líneas continuas).....	51

Figura 2.10. Evolución simulada del pH para los Exps. 1-3.....	55
Figura 2.11: Predicción del tiempo medio de degradación en función de la composición del copolímero y del peso molecular.....	55
Figura 2.12: Distribuciones de pesos moleculares simuladas: a) Exp. 1; b) Exp. 2; y c) Exp. 3.....	56
Figura 2.13: Distribuciones de pesos moleculares simuladas para el Exp. 4.....	57
Figura 3.1: Micrografías de SEM de las microesferas de PLGA: a) Diámetro medio de $8,94 \pm 3,30 \mu\text{m}$; b) Diámetro medio de $52,37 \pm 17,73 \mu\text{m}$	67
Figura 3.2: Evolución de los pesos moleculares medios de las micropartículas de PLGA de diferentes diámetros: a) \overline{M}_n ; b) \overline{M}_w ; (■) $8,94 \pm 3,30 \mu\text{m}$, (●) $52,37 \pm 17,73 \mu\text{m}$, (–) Predicción del modelo.....	68
Figura 3.3: a) Evolución de la pérdida de masa de las micropartículas de PLGA con diferentes diámetros: (■) $8,94 \pm 3,30 \mu\text{m}$, (●) $52,37 \pm 17,73 \mu\text{m}$, (–) Predicción del modelo; b) Evolución de las concentraciones de enlaces éster en las micropartículas de PLGA con diferentes tamaños de partícula (datos experimentales en símbolos y resultados de simulación en líneas continuas).....	69
Figura 3.4: Distribuciones de pesos moleculares simuladas: a) Micropartículas de $8,94 \pm 3,30 \mu\text{m}$; b) Micropartículas de $52,37 \pm 17,73 \mu\text{m}$	72
Figura 3.5: Perfiles radiales de \overline{M}_w simulados en el interior de las micropartículas durante la degradación: a) Micropartículas de $8,94 \pm 3,30 \mu\text{m}$; b) Micropartículas de $52,37 \pm 17,73 \mu\text{m}$	72
Figura 3.6: Efecto del diámetro medio de partícula sobre la velocidad de degradación. a) Evolución estimada de \overline{M}_w ; b) Evolución estimada de la pérdida de masa.....	73
Figura 3.7: Efecto del peso molecular inicial del PLGA sobre la degradación de micropartículas de $50 \mu\text{m}$. a) Evolución estimada de \overline{M}_w (datos experimentales en símbolos y resultados de simulación en líneas continuas). Los datos experimentales fueron tomados de Raman y col. (2005); b) Evolución estimada de la pérdida de masa.....	74
Figura 4.1: Dispositivo de microfluídica empleado para la preparación de las micropartículas.....	82
Figura 4.2: Imágenes ópticas de las microesferas de PLGA.....	88
Figura 4.3: Distribuciones de tamaño de partícula de las microesferas de PLGA....	89

Figura 4.4: Gotas de la emulsión obtenidas mediante el dispositivo de microfluídica con un caudal de fase continua constante ($1020 \mu\text{L h}^{-1}$) y un caudal de fase dispersa variable: a) $150 \mu\text{L h}^{-1}$; b) $300 \mu\text{L h}^{-1}$; c) $450 \mu\text{L h}^{-1}$; d) $600 \mu\text{L h}^{-1}$; e) $1020 \mu\text{L h}^{-1}$90

Figura 4.5: Microesferas de PLGA obtenidas mediante el dispositivo de microfluídica con un caudal de fase continua constante ($1020 \mu\text{L h}^{-1}$) y un caudal de fase dispersa variable: a) $150 \mu\text{L h}^{-1}$; b) $300 \mu\text{L h}^{-1}$; c) $450 \mu\text{L h}^{-1}$; d) $600 \mu\text{L h}^{-1}$; e) $1020 \mu\text{L h}^{-1}$91

Figura 4.6: a) Diámetro medio de gotas y de micropartículas obtenidas mediante el dispositivo de microfluídica en función de caudal de fase dispersa, empleando un caudal constante de fase continua ($1020 \mu\text{L h}^{-1}$); b) Diámetro medio de partículas en función del diámetro medio de gotas.....92

Figura 4.7: Termogramas de DSC de progesterona, PLGA y de las micropartículas de PLGA cargadas con progesterona92

Figura 4.8: Resultados experimentales y teóricos para los Exps. C ($D_p = 131,3 \pm 45,8 \mu\text{m}$) y D ($D_p = 87,9 \pm 3,6 \mu\text{m}$). a) y b) Perfiles de liberación *in vitro* de progesterona; c) y d) Evoluciones simuladas de pesos moleculares medios y pérdida de masa.....93

Figura 4.9: Resultados experimentales y teóricos para los Exps. A ($D_p = 9,3 \pm 4,4 \mu\text{m}$) y B ($D_p = 71,6 \pm 19,3 \mu\text{m}$). a) y b) Perfiles de liberación *in vitro* de progesterona; c) y d) Evoluciones simuladas de pesos moleculares medios y pérdida de masa.....95

Figura 4.10. Efecto teórico del tamaño de partícula y del peso molecular inicial del polímero sobre los perfiles de liberación *in vitro* de progesterona. a) Efecto del tamaño de partícula; b) Efecto del peso molecular inicial del polímero.....98

Figura 5.1: Estructura química del ácido hialurónico.....102

Figura 5.2: Esquema de la reacción de síntesis del ácido hialurónico metacrilado.....105

Figura 5.3: Dispositivo de microfluídica empleado para la preparación de los microgeles.....106

Figura 5.4: Representación esquemática de la obtención de los microgeles conteniendo nanogotas de aceite mediante microfluídica.....107

Figura 5.5: Espectro de ^1H -RMN del AH-MA.....109

Figura 5.6: Características de la emulsión O1/W (O1= hexadecano, W= solución acuosa de Tween 80): a) Evolución del diámetro medio de gota; b) Evolución del índice de polidispersidad.....	110
Figura 5.7: Microgeles de AH-MA preparados sin la nanoemulsión O1/W.....	111
Figura 5.8: a) y b) Microgeles de pNIPAM sin la nanoemulsión interna; c) y d) Microgeles de pNIPAM que contienen gotitas de aceite: c) Imágenes ópticas; d) Imágenes de fluorescencia.....	112
Figura 5.9: Microgeles de pNIPAM que contienen la emulsión preparada con 1% p ⁻¹ de caseinato de sodio: a) y b) Imágenes ópticas; c) y d) Imágenes de fluorescencia.....	113
Figura 5.10: Microgeles de AH-MA preparados con AH-MA con un grado de metacrilación del 20% sin la adición de agente de entrecruzamiento y hexadecano conteniendo Nile Red como fase aceite: a) Imágenes ópticas; b) Imágenes de fluorescencia.....	114
Figura 5.11: Microgeles de AH-MA preparados con BIS y hexadecano conteniendo Nile Red como fase aceite: a) Imágenes ópticas; b) Imágenes de fluorescencia.....	114
Figura 5.12: Degradación enzimática de un único microgel de AH-MA en el tiempo: a) Transmisión, b) Fluorescencia. La barra de escala es de 200 μm.....	115
Figura 5.13: Características de la emulsión preparada con aceite de girasol conteniendo progesterona: a) Evolución del diámetro medio de gota; b) Evolución del índice de polidispersidad.....	116
Figura 5.14: Imágenes de microscopía óptica de microgeles de AH-MA preparados con BIS y aceite de girasol conteniendo progesterona. La barra de escala es de 250 μm.....	117
Figura 5.15: Fotografías del experimento de liberación de progesterona a partir de microgeles de AH-MA en presencia de hialuronidasas. Cada imagen presenta una solución con microgeles que contienen 100 UI mL ⁻¹ de enzima (vial izquierdo) y 300 UI mL ⁻¹ de enzima (vial derecho).....	117
Figura 5.16: Efecto de la degradación enzimática sobre la liberación de progesterona a partir de los microgeles de AH-MA.....	118
Figura 6.1: Estructura química de la quitina (a) y del quitosano (b).....	121
Figura 6.2: Curva de titulación conductimétrica del quitosano.....	132
Figura 6.3: Distribuciones de pesos moleculares del quitosano y de las microesferas de quitosano.....	133
Figura 6.4: Efecto del caudal de la solución de polímero y del aire de secado sobre el rendimiento de micropartículas.....	133

Figura 6.5: Efecto de la concentración de agente surfactante sobre la solubilidad de la progesterona en las formulaciones.....	134
Figura 6.6: Efecto del contenido de TPP sobre la esfericidad y morfología de las micropartículas. Micrografías ópticas: (a) Micropartículas no entrecruzadas; (b) Micropartículas entrecruzadas con TPP (0,10 g g ⁻¹); (c) Micropartículas entrecruzadas con TPP (0,30 g g ⁻¹). Micrografías de SEM: (d) Micropartículas no entrecruzadas; (e) Micropartículas entrecruzadas con TPP (0,10 g g ⁻¹); (f) Micropartículas entrecruzadas con TPP (0,30 g g ⁻¹).....	136
Figura 6.7: Mediciones de potencial Z de las micropartículas de quitosano con diferente contenido de TPP a pH 4 y 7,4.....	138
Figura 6.8: Espectros de FT-IR de las micropartículas de quitosano no entrecruzadas y entrecruzadas.....	139
Figura 6.9: Efecto del contenido de TPP sobre la eficiencia de encapsulación de la progesterona.....	140
Figura 6.10: Termogramas de DSC de la progesterona y de las micropartículas de quitosano: (a) progesterona; (b) Microesferas no entrecruzadas sin progesterona; (c) Microesferas no entrecruzadas conteniendo progesterona; (d) Microesferas entrecruzadas con TPP (0,10 g g ⁻¹) conteniendo progesterona; (e) Microesferas entrecruzadas con TPP (0,30 g g ⁻¹) conteniendo progesterona.....	141
Figura 6.11: Perfiles de liberación <i>in vitro</i> de progesterona a partir de microesferas de quitosano entrecruzadas con TPP (0,30 g g ⁻¹) empleando diferentes condiciones de dispersión y muestreo. (a) Dispersión por sonicación y muestreo con centrifugación; (b) Dispersión por sonicación y muestreo sin centrifugación; (c) Dispersión sin sonicación y muestreo sin centrifugación; (d) Dispersión sin sonicación en bolsa de diálisis y muestreo sin centrifugación.....	141
Figura 6.12: Perfiles de liberación <i>in vitro</i> de progesterona a partir de microesferas de quitosano en diferentes condiciones de pH: (a) pH 4,0; (b) pH 7,4.....	143
Figura 6.13: Resultados de simulación de modelo. a) Perfiles de liberación <i>in vitro</i> de progesterona a partir de microesferas de quitosano y caseína; b) Concentración plasmática de progesterona en conejos.....	145
Figura 6.14: Predicciones teóricas del modelo sobre la liberación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de progesterona a partir de las micropartículas de quitosano-TPP. a) Efecto del tamaño de partícula; b) Efecto del contenido inicial de progesterona; c) Efecto de la cantidad de micropartículas inyectadas.....	147

Abreviaturas

AH	Ácido hialurónico
AH-MA	Ácido hialurónico metacrilado
AMA	Anhídrido metacrílico
BIS	N,N'-metilenbisacrilamida
CS	Caseinato de sodio
DC	Diclorometano
DLCN	Distribución de longitud de cadena en número
DLCP	Distribución de longitud de cadena de peso
DM	Grado de metacrilación
DMF	N,N-dimetilformamida
DPM	Distribuciones de pesos moleculares
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
EE	Eficiencia de encapsulación
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
FDA	Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
FSH	Hormona foliculoestimulante
GD	Grado de desacetilación
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
HD	Hexadecano
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
LH	Hormona luteinizante
\overline{M}_n	Peso molecular promedio en número
M_{UR}	Peso molecular promedio de la unidad repetitiva
\overline{M}_w	Peso molecular promedio en peso
NIPAm	N-isopropilacrilamida
o/o	Emulsión aceite/aceite
o/w	Emulsión aceite/agua
o/w/o	Emulsión aceite/agua/aceite

OTS	Octadeciltriclorosilano
PBS	Buffer fosfato salino
PG	Progesterona
PGA	Poli(ácido glicólico)
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PLA	Poli(ácido láctico)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-glicólico)
PVA	Poli(vinilalcohol)
RA	Relación de aspecto
SEC	Cromatografía de Exclusión por Tamaño
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
THF	Tetrahidrofurano
TPP	Tripolifosfato de sodio
w/o/w	Emulsión agua/aceite/agua

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Introducción

El mercado mundial de sanidad animal comprendió US\$ 19,2 billones en 2009 y creció a unos US\$ 24 billones en 2015, mientras que actualmente se estima una tasa de crecimiento anual constante del 3% hasta 2020 (Evans, 2009; Kisaco Research, 2016). Las ventas comprenden dos segmentos: el 60% aproximadamente corresponde a los animales de cría y el 40% a los animales de compañía. En términos de especies, el mercado de animales de cría se compone de ganado bovino (45%), cerdos (27%), aves (19%), ovejas (8%) y otros (1%). A su vez, el mercado mundial de sanidad animal también se puede clasificar en grupos de productos. Esta descripción muestra que las vacunas/productos biológicos, los productos farmacéuticos y los aditivos alimentarios abarcan el 25%, 63% y 12% del mercado, respectivamente (Rathbone, 2012). La adopción del mercado de nuevas formulaciones farmacéuticas de uso veterinario se encuentra impulsada principalmente por la facilidad de las terapias (a través de la reducción de la frecuencia de los servicios veterinarios y de la administración de agentes terapéuticos), el mayor control y prolongación de sus efectos, la disminución del estrés de los animales y de los trabajadores, la reducción de los costos y la mejora de la gestión de los rebaños. Aunque existen similitudes con los productos destinados a la salud humana, la complejidad en el campo de la sanidad y producción animal es algo mayor debido a la diversidad de especies y razas, al amplio rango de masa corporal, a las variaciones regionales y a las diferentes velocidades de metabolización de las drogas administradas.

Actualmente, existe un interés creciente en el desarrollo de métodos de sincronización del celo de bovinos (destinados a carne o leche) con el fin de lograr un impacto económico en los sectores productivos involucrados. Para el desarrollo de estos métodos es esencial conocer, en primera instancia, el ciclo estral de la vaca, así como los factores que lo regulan.

1.2 Fases del ciclo estral bovino

El ciclo estral representa un patrón cíclico de actividad ovárica que permite a las hembras ir de un periodo reproductivo de no receptividad a uno de receptividad, permitiendo establecer el apareamiento y la subsecuente gestación (Forde y col., 2011). El ciclo estral varía normalmente entre 17 a 24 días, considerándose 21 días como el

tiempo promedio y se encuentra regulado por la interacción de varios órganos, entre ellos se encuentran el eje hipotálamo-hipófisis, el ovario y el útero.

El ciclo estral se puede dividir en tres fases:

1. Fase Folicular o de regresión del cuerpo lúteo (proestro);
2. Fase Periovulatoria (estro y metaestro);
3. Fase Luteal (diestro).

El día 0 del ciclo estral es el día del celo, signo visible a simple vista. Sin embargo, desde el punto de vista fisiológico, la descripción se realizará a partir de la destrucción del cuerpo lúteo y finalizará en la destrucción del cuerpo lúteo del próximo ciclo.

1.2.a Fase folicular o de regresión del cuerpo lúteo (proestro)

Este período, cuya duración es de 3 días, comienza con la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior debido a la acción de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) de origen uterino y finaliza con la manifestación de celo. La destrucción del cuerpo lúteo provoca una caída en los niveles de progesterona y, posteriormente, una pérdida de tejido luteal. Como consecuencia de la caída de los niveles de progesterona, el efecto de retroalimentación negativa ejercido a nivel hipotalámico desaparece y comienza a aumentar la frecuencia pulsátil de las hormonas hipofisarias (FSH y LH), las cuales estimulan el crecimiento folicular y el aumento de los niveles de estrógenos. El incremento en los niveles de estrógenos del folículo preovulatorio alcanza los centros nerviosos del hipotálamo que controlan las manifestaciones externas de celo.

1.2.b Fase periovulatoria (estro y metaestro)

El estro se define como un período de actividad y receptividad sexual, en el cual se observa entre otros signos, inquietud, inflamación de la vulva, secreción de mucosa vaginal (Shearer, 2003). El olor de la mucosa vaginal atrae y excita al toro debido a la presencia de feromonas. La duración de celo es muy variable entre grupos de animales, comprendiendo entre 30 minutos a más de 30 horas (Lucy, 2006), pero se considera que el tiempo promedio es de 16 ± 4 horas. Los signos de estro se manifiestan gracias a la presencia de los estrógenos provenientes del folículo. En cierto momento, los niveles de estrógenos son lo suficientemente altos en concentración y duración como para inducir los síntomas del celo o calor (Wiltbank y col., 2006), así como para incrementar las contracciones del tracto reproductivo facilitando el transporte del esperma y del óvulo.

Estos altos niveles de estrógenos afectan también a centros endócrinos en el hipotálamo que controlan la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) del hipotálamo, y ésta a su vez controla la liberación de FSH y LH de la adeno-hipófisis. El incremento de los niveles de LH ocurre después de que se hayan iniciado los signos de celo e inicia el proceso de ovulación (Lucy, 2006). La LH es generalmente considerada como la gonatropina primaria responsable de la ovulación, sin embargo, la FSH también ha sido observada como causante de ovulación y de formación de tejido luteal (Lamb y col., 2009). Los niveles de FSH se incrementaran en amplitud unas horas después del pico de LH. De 12 a 24 horas desde el comienzo del celo, el sistema nervioso central del animal se hace refractario a los estrógenos y todas las manifestaciones de celo o calor desaparecen. Inmediatamente después de finalizado el celo se inicia el metaestro, que puede durar de 3 a 5 días. Durante el metaestro ocurre la ovulación, que tiene lugar entre 28 a 32 horas después de haberse iniciado el celo, o entre 10 a 15 horas de haber cesado los signos de celo en respuesta al pico preovulatorio de LH. Después de la ovulación se produce una hemorragia y el folículo se llena de sangre, convirtiéndose en una estructura conocida como cuerpo hemorrágico. El proceso siguiente es la luteinización de las células foliculares que se transformarán en células luteales. Estos cambios ocurren entre el día 5 a 7 del ciclo, finalizando así la fase de metaestro e iniciándose la fase lútea o diestro.

1.2.c Fase luteal (diestro)

Esta fase se caracteriza por la presencia y dominio del cuerpo lúteo en el ovario y la producción de progesterona, y está regulada por las secreciones de la glándula pituitaria anterior, útero, ovario y la presencia de un embrión, y va desde el día 5 del ciclo estral hasta el día 18. La regulación de la secreción de progesterona está controlada por un equilibrio de estímulos: uno luteotrópico o que estimula la progesterona y otro luteolítico o que inhibe la progesterona; ambos estímulos son secretados al mismo tiempo durante el ciclo estral. La hormona LH que es considerada primariamente luteotrópica y la concentración de receptores luteales a la LH están directamente relacionados con los cambios en los niveles de progesterona y el crecimiento del cuerpo lúteo en el ovario (Lamb y col., 2009). La hormona FSH también interviene uniéndose a receptores en el cuerpo lúteo y provoca un aumento en la secreción de progesterona. El cuerpo lúteo recibe la mayoría del flujo sanguíneo del ovario y el flujo recibido esta altamente relacionado con la cantidad de progesterona producida y secretada. Los

niveles de progesterona más altos se alcanzan en torno al día 10 del ciclo estral y se mantienen hasta el día 16 o 18 del ciclo dependiendo de la presencia o no de un embrión. Si la vaca está preñada, el cuerpo lúteo se mantiene, los niveles de progesterona son altos y se bloquea la reaparición de celos. El embrión alcanza el útero entre los días 3 a 4 del ciclo estral; durante los siguientes 10 a 12 días el embrión crecerá rápidamente y comenzará la formación de la placenta. La presencia de estas células embrionarias son las responsables de producir una señal química que bloquea la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ por parte del útero, impidiendo la regresión del cuerpo lúteo en torno al día 16 del ciclo estral. Este proceso se conoce con el nombre de “reconocimiento maternal”. Por tanto, el mantenimiento del cuerpo lúteo y los altos niveles de progesterona dependen de la presencia de un embrión en desarrollo en el útero. Si la vaca no está preñada, el cuerpo lúteo es inducido a degenerar por la acción de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Lamb y col., 2009). En este caso, la ausencia de un embrión y de las señales químicas que éste produce, provoca que las concentraciones de $\text{PGF}_{2\alpha}$ se incrementen durante la parte final de la fase luteal o diestro (Fig. 1.1). Con la regresión del cuerpo lúteo, comienza la disminución de los niveles de progesterona y con ello el final de la fase luteal o diestro y el reinicio del proestro o fase de regresión del cuerpo lúteo.

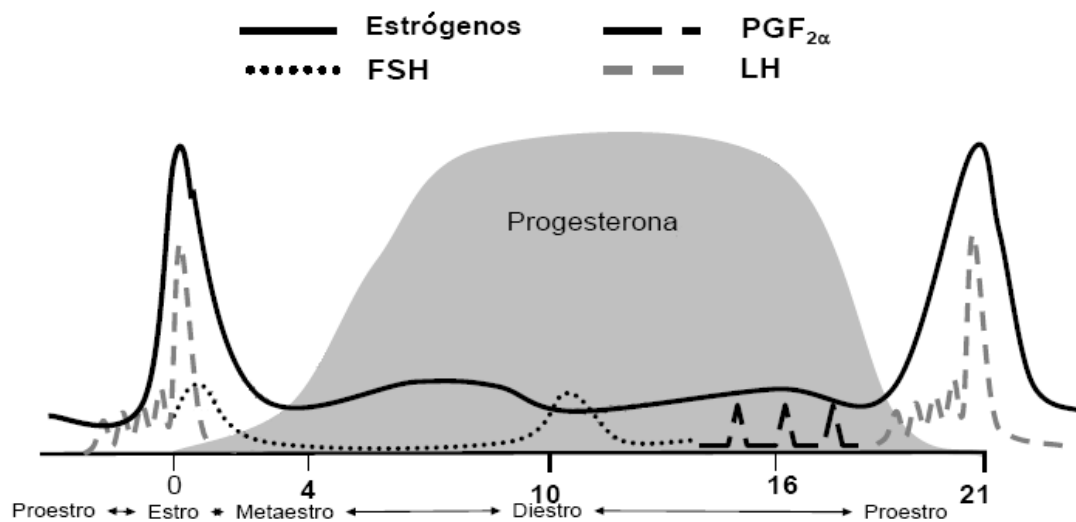


Figura 1.1: Nivel relativo de hormonas durante el ciclo estral bovino.

1.3 Métodos de sincronización del celo de bovinos

Tradicionalmente, la detección de hembras que se encuentran con conducta de celo es uno de los aspectos más importantes en los programas de inseminación artificial, ya que normalmente a partir de dicha manifestación se planifica el momento de la siembra de semen. El método más usado es el reconocimiento de los signos característicos del celo mediante observación visual. El celo suele manifestarse visualmente por el incremento en la secreción de mucosa vaginal y por la actitud pasiva ante la monta por otro animal. Si bien la observación visual es una técnica simple y práctica, se producen importantes errores debido a su mala implementación. Roelofs y col. (2005) estudiaron la relación entre los signos característicos del celo y el tiempo de ovulación. Reportaron que la actitud pasiva ante la monta se detectó sólo en el 58% de los casos mediante observación visual, y algunos grupos presentaron una tasa de detección del celo de sólo el 20% cuando sólo una vaca estaba en celo. La diferencia temporal en la entrada en celo entre un animal y otro de un mismo rodeo, sumado a los errores en la detección, genera una dispersión en las pariciones de semanas o meses, lo cual hace muy ineficiente el control y desarrollo de los terneros recién nacidos en lo que se refiere a programas de vacunación, alimentación, siembra de forrajes, aprovechamiento del personal involucrado, entre otras deficiencias (Weibel y col., 2014). Esto repercute en un mal aprovechamiento de los recursos disponibles y, en consecuencia, un mayor costo de explotación. Por otro lado, la expresión de la conducta de celo puede estar anulada o variar en intensidad y duración por diversos factores como el clima, la nutrición, el amamantamiento y la raza (Roelofs y col, 2010). No obstante, los factores asociados a la calidad con que se ejecuta la técnica de detección de celos son los que afectan principalmente la eficiencia y/o la exactitud del diagnóstico, entre los más importantes se pueden mencionar: conocimiento de los signos y síntomas de una hembra en celo, elección del lugar de detección, tiempo y frecuencia de observación. Por esto, se han desarrollado diversos métodos de ayuda, tales como la utilización de animales marcadores, pintura en la grupa, cápsula detectora de monta, detectores de la actividad motora (pedómetros) y radiotelemetría (Cavalieri y col., 2003; Catalano y Callejas, 2001; Firk y col., 2002; At-Taras y Spahr, 2002; Galon, 2010). Si bien este último es el método que mejores resultados ha obtenido, dado su costo y dificultad de implementación no puede ser considerado de elección para los sistemas de producción del país en la actualidad (Catalano y Callejas, 2001). Existen otros métodos que no se

encuentran relacionados con cambios en la conducta sino que detectan cambios en los procesos fisiológicos, tales como cambios en la temperatura corporal, resistencia eléctrica vaginal, perfiles de progesterona y olor de la zona perineal mediante un detector electrónico (Fisher y col., 2008; Catalano y Callejas, 2001; Kyle y col., 1998; Scipioni y Foote, 1999; Lane y Wathes, 1998). Si bien dichos métodos plantean una alternativa sumamente interesante a utilizar en el futuro, aún no se ha logrado un uso masivo ya que en algunos casos no es práctica su implementación, el costo es demasiado alto y/o la eficiencia o la exactitud de detección no es adecuada.

Una alternativa a los métodos de detección del celo son los métodos de sincronización del celo. Éstos se basan en la administración de un protocolo hormonal al animal de manera que se lo obliga a entrar en el ciclo estral, y al cabo de ciertos días se realiza la inseminación artificial. El análisis de la bibliografía permite identificar diversos sistemas de sincronización del celo. Las vías más comunes para la administración de hormonas han sido la intravaginal y la subcutánea (Rathbone y col., 1998). Los protocolos consisten en la administración sincronizada de hormonas que permitan simular los niveles plasmáticos de los animales en un ciclo estral normal. De esta manera, se manipula la actividad ovárica con el fin de predecir la ovulación sin la necesidad de detectar el celo. Los protocolos más comúnmente utilizados en los establecimientos ganaderos se basan en la administración de una o más hormonas al animal. Existen varias hormonas que pueden emplearse en la sincronización del celo vacuno: progesterona, metilacetoxiprogesterona, acetato de fluorogestona, benzoato de estradiol, melatonina, prostaglandina $F_{2\alpha}$ (Rathbone y col., 1998; Rathbone y col., 2000). La forma más común de simular una fase lútea normal se logra administrando progesterona exógena de tal forma que los niveles plasmáticos superen los valores basales de 1 ng mL^{-1} durante un período de 5 a 10 días, dependiendo del protocolo utilizado. Sin embargo, existen trabajos donde se reportan bajos porcentajes de preñez o disminución de la fertilidad cuando la concentración de progesterona plasmática no supera los 2 ng mL^{-1} (Shaham-Albalancy y col., 2000).

1.4 Sistemas intravaginales de liberación controlada de hormonas

La vagina de animales de granja, tales como vacas y ovejas, es un sitio atractivo para la administración de fármacos debido a la facilidad con la que los dispositivos pueden ser administrados y removidos, a sus propiedades biológicas y a su capacidad para

retener los sistemas de administración de fármacos por periodos prolongados (semanas). Para los medicamentos que son susceptibles al metabolismo gastrointestinal o hepático, la vía vaginal puede proporcionar una alternativa a la vía de administración oral.

Los sistemas de administración de fármacos veterinarios intravaginales incluyen esponjas de poliuretano que contienen progestágenos sintéticos, insertos basados en silicona que contienen la hormona progesterona, entre los cuales se encuentran el PRID, el CIDR-B y el CIDR 1380, inserciones controladas electrónicamente (IBD y EMIDD) capaces de administrar múltiples fármacos a un tiempo predefinido, e insertos biodegradables basados en poli(ϵ -caprolactona) (Rathbone y Brayden, 2009; Brayden y col., 2010; Rathbone y col., 2000; Rathbone y col., 2001; Robinson y Rathbone, 1999; Rathbone y Macmillan, 2004). En la Fig. 1.2 se muestran algunos de los diferentes dispositivos de liberación de drogas intravaginales disponibles comercialmente.

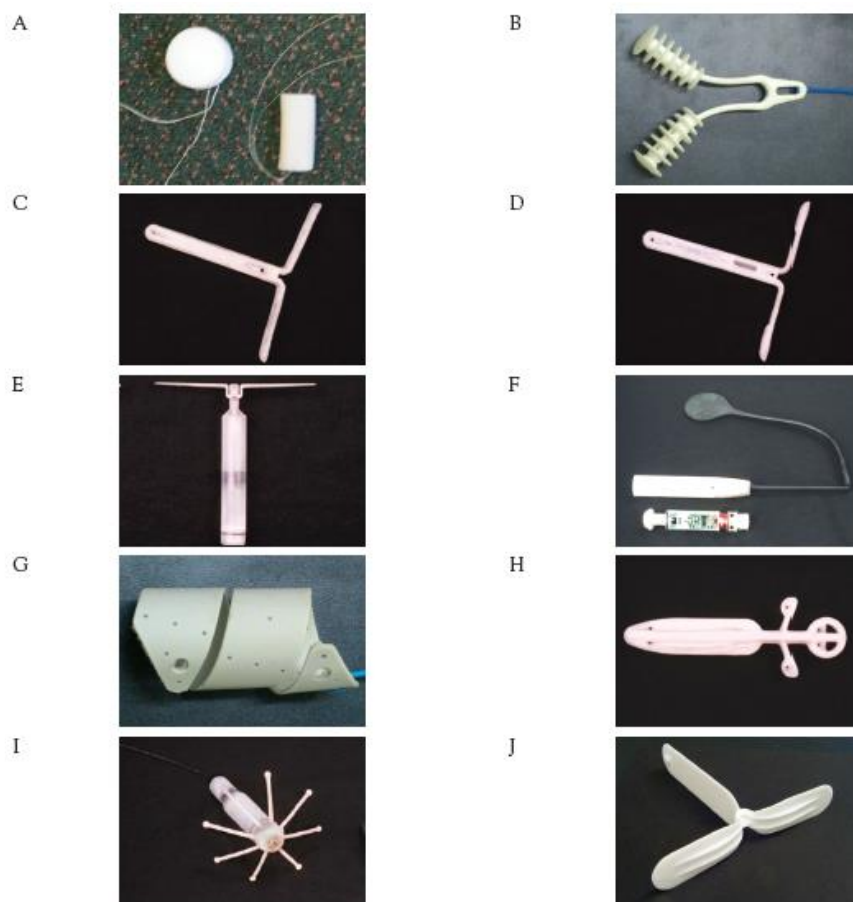


Figura 1.2: Tecnologías disponibles en el mercado para la administración de fármacos intravaginales usados en animales de granja. A = esponjas; B = CueMate; C = CIDR-B; D = CIDR 1380; E = EMIDD; F = Smartt1; G = PRID; H = CIDR; I = IBD; J = PCL (Rathbone, 2012).

La utilización de los dispositivos intravaginales no ha sido extendida debido a diversos inconvenientes. Uno de los problemas es la eficiencia de retención, esto se debe a que la producción en serie no permite tener en cuenta la diversidad fisiológica de la cavidad vaginal de las vacas, que difieren en tamaño y contextura, de acuerdo a la raza, edad y número de servicios previos del animal. La segunda desventaja de los dispositivos intravaginales es el manejo que debe hacerse del animal. El uso de dispositivos intravaginales requiere la inmovilización del animal al menos dos veces (colocación y remoción del dispositivo) con las dificultades que acarrea, además de las medidas de higiene y seguridad que es necesario adoptar para evitar la transmisión de enfermedades al animal y el contacto del operador con la droga. El último inconveniente, pero no menos importante, es que la cantidad de droga residual del dispositivo es muy elevada. Aproximadamente el 50% de la carga hormonal permanece en el dispositivo luego de su uso (Rathbone y col., 1998). Esto genera, por un lado, un problema económico ya que la progesterona es el constituyente más costoso, y por el otro, un problema medioambiental porque es necesario una correcta disposición final del dispositivo (debe ser enterrado y/o incinerado). Hay estudios que aconsejan un segundo y hasta un tercer reuso del dispositivo para aprovechar la carga residual, sin embargo la eficiencia es menor y se añade la necesidad de higienizar el dispositivo previo a su reutilización para evitar la transmisión de enfermedades infecciosas entre los animales (Colazo y col., 2004).

1.5 Liberación controlada de hormonas vía parenteral

Los sistemas de administración de hormonas implantables fueron el primer sistema de administración subcutánea que se desarrolló. Estos sistemas comprenden tubos o discos hechos de silicona u otros polímeros biocompatibles, no necesariamente biodegradables, que han sido cargados de alguna manera con progesterona u otra hormona (Weibel y col., 2014). Estos sistemas se implantan bajo la piel del animal con una pequeña cirugía para permitir la liberación de la hormona directamente al cuerpo del animal. La eficacia de estos sistemas de liberación en general es bastante buena. Sin embargo, el problema de dosificación persiste porque los implantes se fabrican con una carga hormonal única. En algunos casos, es necesaria una cirugía adicional para la extracción de los sistemas remanentes. El gran tamaño de los implantes, la necesidad de inmovilizar al animal para la cirugía y la necesidad de condiciones asépticas adecuadas en la cirugía generan serias dudas sobre la viabilidad de estos tipos de sistemas. Se han diseñado dispositivos

implantables en el tejido subcutáneo de la oreja de los animales como una forma de disminuir la droga residual en los animales de producción y para facilitar las operaciones de implante y extracción de los dispositivos (Medlicott y col., 2004).

En los últimos años, los sistemas biodegradables de liberación controlada de drogas (antibióticos, antiparasitarios, hormonas, péptidos y proteínas) vía parenteral han adquirido una creciente importancia en medicina veterinaria (Medlicott y col., 2004; Sun y col., 2004). Estos sistemas permiten prolongar el efecto terapéutico de la droga, eliminan la necesidad de la inmovilización del animal, no requieren de estrictas condiciones asépticas, son biodegradables y tienen un mejor aprovechamiento de la carga hormonal. Esto permite aplicar tratamientos de forma masiva y disminuir el estrés tanto en los animales como en sus propietarios (Medlicott y col., 2004; Winzenburg y col., 2004).

Se han desarrollado diferentes formulaciones veterinarias de liberación controlada de progesterona que emplean polímeros biodegradables y que, por tanto, no requieren la extracción del dispositivo. Entre ellos se pueden mencionar los implantes biodegradables y los sistemas inyectables preformados y de formación *in situ*. Los sistemas implantables incluyen polímeros tales como celulosa, acetato de celulosa, quitosano y copolímeros de ácido glutámico y terc-butoxicarbonil metil glutamato (Iqbal y Middha, 2016; Lescure y col., 1995). Estos sistemas requieren una cirugía para acceder a los tejidos subcutáneos e implantar allí el sistema de administración.

Los sistemas inyectables acceden a estos tejidos a través del uso de agujas veterinarias. Una inyección no necesita condiciones de asepsia rigurosas, es más simple y rápida que un implante y tiene la posibilidad de variar las dosis ajustando el volumen inyectado, sin la necesidad de personal altamente calificado. Entre los sistemas de administración inyectables se destacan los sistemas preformados y los sistemas de formación *in situ*. Los sistemas inyectables de formación *in situ* consisten en una solución polimérica que contiene la droga y que, en condiciones fisiológicas, precipita formando un depósito donde queda entrampada la droga que luego será liberada (Turino y col., 2014; Dewan y col., 2007; Brodbeck y col., 2000; Dunn y col., 1994). En estos casos, la forma del depósito es difícil de predecir y por tanto, no hay control preciso sobre la superficie expuesta y la velocidad de liberación. Otro tipo de sistema inyectable consiste en emplear dispersiones o suspensiones de micropartículas previamente formadas. Para este fin se han empleado polímeros tales como PLGA, PLA, quitosano y caseína (Wu y col., 2004; Latha y col., 2000; Yang y Owusu-Ababio, 2000; Jameela y

col., 1998). La fabricación de partículas que contienen la droga encapsulada es la alternativa de mayor auge en las últimas décadas. Los sistemas de liberación controlada de fármacos basados en microesferas son los que presentan mayores ventajas como fácil preparación, reproducibilidad, capacidad de incorporación de varios tipos de drogas, fácil administración y cinética de liberación controlada, entre otras (Wu, 2004).

1.6 Polímeros biodegradables

Una amplia variedad de matrices poliméricas biodegradables, tanto naturales como sintéticas, han sido investigadas para su aplicación en formulaciones farmacéuticas (Fig. 1.3). Dentro de los polímeros naturales se pueden destacar: alginato, quitosano, heparina y ácido hialurónico (Li y col., 2012; Jana y col., 2011; Messenger y col., 2013; Jameela y col., 1998). Entre los polímeros sintéticos se pueden mencionar: poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico-co-glicólico), poli(ε-caprolactona), polietilenglicol y poliuretanos, entre otros (Weibel y col., 2014; Winzenburg y col., 2004; Matschke y col., 2002; Wu, 2004; Chang y col., 2005; Chiappetta y col., 2005).

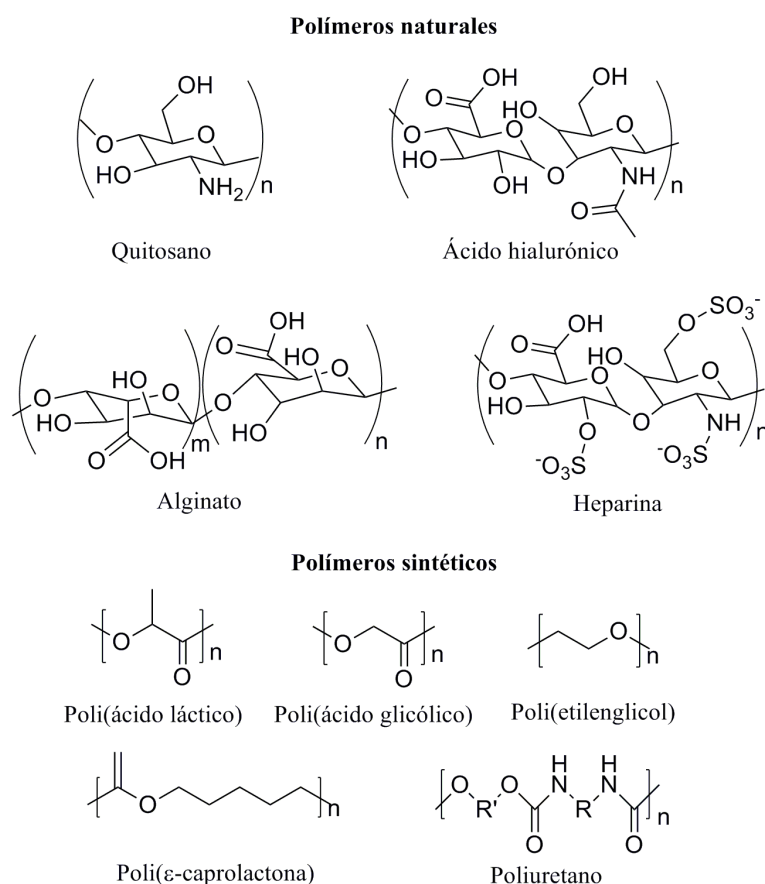


Figura 1.3: Estructura química de polímeros biodegradables naturales y sintéticos.

Para poder ser aplicados en una formulación farmacéutica dichos materiales deben cumplir con el requisito de biocompatibilidad (Helmus y col., 2008). Para esto, los mismos deben ser compatibles con el tejido y degradarse cierto tiempo después de ser implantados dando lugar a productos que no son tóxicos y puedan ser eliminados por el organismo o metabolizados por éste.

1.7 Métodos para la preparación de microesferas

Se han empleado diversos métodos para la preparación de microesferas. En general, los métodos comúnmente empleados son modificaciones de las siguientes tres técnicas: extracción/evaporación de solvente, separación de fases, y secado por atomización (Freitas y col., 2005; Wischke y Schwendeman, 2008). Además, para este propósito se han estudiado técnicas de microfluídica (Duncanson y col., 2012) y estrategias de formación *in situ* para la preparación *in vivo* de microesferas (Turino y col., 2014). Los métodos empleados para este fin deben cumplir con los siguientes requisitos:

- No deben afectar la estabilidad y la actividad biológica de la droga durante el proceso de síntesis.
- El rendimiento de las microesferas y la eficiencia de atrapamiento de la droga debe ser alto, y la distribución de tamaños de partículas debe ser estrecha.
- Las microesferas no deben agregarse, para facilitar su inyectabilidad.
- El perfil de liberación debe ser reproducible dentro de condiciones pre-establecidas.

1.7.a Evaporación/extracción de solvente

El método de evaporación/extracción de solvente es el procedimiento más utilizado para fabricar microesferas para estudios de microencapsulación a pequeña escala. Este método comprende básicamente cinco etapas (Freitas y col., 2005): (i) disolución del polímero en un solvente adecuado; (ii) disolución o dispersión del principio activo para formar la fase dispersa; (iii) emulsificación de la solución polímero/fármaco en una fase continua conteniendo un agente surfactante; (iv) eliminación del disolvente de la fase dispersa por evaporación y/o extracción hacia la fase continua para convertir las pequeñas gotas en microesferas sólidas; (v) recolección y secado de las microesferas. Una de las ventajas principales de este método es que no requiere temperaturas elevadas o la adición de agentes para inducir la separación de fases. Se han identificado diversas

variables del proceso que pueden afectar a la formulación de microesferas, tales como la relación de volumen entre las fases dispersa y continua, la concentración de polímero, la relación fármaco/polímero, la velocidad de eliminación del solvente y la concentración de agente surfactante, entre otros (Mao y col., 2008). Los parámetros y condiciones de formulación se deben optimizar en cada sistema para obtener microesferas de un tamaño determinado, alcanzar altas eficiencias de encapsulación y un bajo contenido de solvente residual en las microesferas (Tiwari y Verma, 2012).

Dependiendo de la naturaleza y solubilidad de la droga a encapsular, se deben utilizar diferentes solventes. Esto conduce al desarrollo de varias técnicas basadas en el método de extracción/evaporación de solvente: emulsión aceite/agua (o/w), emulsión agua/aceite/agua (w/o/w) y emulsión aceite/aceite (o/o).

1.7.b Emulsión aceite/agua (o/w)

La técnica de emulsión aceite/agua (o/w) se utiliza principalmente para fármacos hidrofóbicos, tales como los esteroides (Jain, 2000), los cuales son solubles en varios solventes orgánicos y poco solubles en agua. La técnica consiste en disolver el polímero y el fármaco en un disolvente orgánico apropiado. El disolvente orgánico más común utilizado es el cloruro de metileno (diclorometano). Además, pueden emplearse acetato de butilo, acetato de etilo, formiato de etilo y metiletilcetona (Wischke y Schwendeman, 2008). Posteriormente, la fase orgánica se emulsiona en una fase continua acuosa que contiene un agente tensioactivo para formar pequeñas gotas. Estos disolventes pueden ser eliminados de las emulsiones por evaporación (Vrancken y Claeys, 1970a; Wang y Schwendeman, 1999) o por extracción hacia la fase continua (Albayrak, 2005; Vrancken y Claeys, 1970b). Finalmente, las microesferas sólidas se recolectan por centrifugación o filtración y se secan al vacío o por liofilización.

1.7.c Emulsión agua/aceite/agua (w/o/w)

La técnica de emulsión agua/aceite/agua (w/o/w, también denominada $w_1/o/w_2$) se utiliza típicamente para fármacos solubles en agua, tales como péptidos, proteínas y vacunas (Meng y col., 2003; Wischke y Schwendeman, 2008). La técnica consiste en las siguientes etapas: (i) disolver el fármaco en una solución acuosa para formar la fase w_1 ; (ii) disolver el polímero en el solvente orgánico apropiado; (iii) emulsionar la fase w_1 en la solución polimérica para formar la emulsión primaria; (iv) emulsionar la

emulsión primaria en una segunda solución acuosa que contiene un estabilizador para formar la doble emulsión; (v) eliminación del solvente orgánico por evaporación o extracción para solidificar las microesferas; (vi) recolección y secado de las microesferas sólidas (Meng y col., 2003). El cloruro de metileno y acetato de etilo son los solventes orgánicos más utilizados en la técnica de doble emulsión.

1.7.d Emulsión aceite/aceite (o/o)

La técnica de emulsión aceite/aceite (o/o, también denominada o_1/o_2) se emplea comúnmente para fármacos hidrofóbicos que presentan una solubilidad apreciable en agua. La encapsulación de este tipo de fármacos por la técnica de emulsión o/w resulta en bajas eficacias de encapsulación debido al flujo del agente activo desde la fase dispersa a la fase continua de mayor volumen durante el proceso de encapsulación. La técnica consiste en las siguientes etapas: (i) disolver el polímero y el fármaco en un solvente orgánico para formar la fase o_1 ; (ii) emulsionar la fase o_1 en una solución de un emulsificante en aceite (fase o_2) para formar pequeñas gotas; (iii) eliminación del disolvente de la fase o_1 , típicamente por extracción o evaporación, para solidificar las microesferas; (iv) separación de las microesferas y secado de las mismas (Wischke y Schwendeman, 2008). El acetonitrilo se usa comúnmente como fase o_1 mientras que el aceite de semilla de algodón y el aceite mineral se utilizan como fase o_2 (Wada y col., 1990). La fase o_2 debe ser un solvente pobre tanto para el polímero como para la droga (Wada y col., 1990).

1.7.e Separación de fases (coacervación)

Otro método para la preparación de micropartículas es el de separación de fases (coacervación). El término coacervación se utiliza tradicionalmente para describir procesos de agregación macromolecular (o separación de fases) producidos por la desolvatación parcial de macromoléculas totalmente solvatadas (Bungenberg de Jong, 1949). Los principios de coacervación se aplicaron a las soluciones de polímero para desarrollar el método de separación de fases. En primer lugar, el polímero y fármaco se disuelven en un disolvente adecuado. A continuación, se induce la desolvatación parcial del polímero disminuyendo su solubilidad. Este fenómeno es una etapa intermedia entre la disolución y la precipitación (desolvatación completa). A medida que la solubilidad del polímero disminuye a causa de la introducción gradual de un agente de

desolvatación, los coacervados macromoleculares aparecen inicialmente como gotitas diminutas (núcleos de coacervado) que contienen una concentración relativamente más alta del polímero en comparación con la solución. A medida que continúa la introducción del agente coacervador, estos núcleos (gotitas primarias) crecen cada vez más y se unen para formar gotitas progresivamente más grandes. En ausencia de un agente estabilizador y de agitación, la coalescencia de las gotitas continúa y conduce a la formación de gotas de coacervado muy grandes y finalmente a la separación macroscópica de fases. Cuando el proceso de coacervación se lleva a cabo bajo condiciones cuidadosamente controladas, los parámetros de fabricación (por ejemplo, la concentración del estabilizador, la velocidad de agitación, etc.) pueden ajustarse fácilmente para producir gotitas de coacervado en el intervalo de tamaños deseado (Arshady, 1990). Estas gotitas se pueden solidificar posteriormente (por eliminación de disolvente o por entrecruzamiento) para obtener las correspondientes nano/microesferas. Por otro lado, si hay partículas sólidas insolubles o gotas de líquido inmiscibles suspendidas en el medio, las gotas de coacervado formadas pueden ser adsorbidas en la superficie de las partículas dispersadas. Cuando el coacervado se deposita en la superficie, envuelve el núcleo con una película fluida y viscosa del polímero. La película fluida es posteriormente solidificada para formar una cápsula dura alrededor del núcleo (Dobetti y Pantaleo, 2002). Las estrategias para inducir la coacervación dependen principalmente de las características fisicoquímicas del polímero y del núcleo a recubrir. La reducción en la solubilidad del polímero se puede lograr por diferentes estrategias, tales como cambios de temperatura, modificación del pH, adición de un “no-solvente” y adición de una sal (Srinidhi y col., 2015). Se observó una menor eficiencia de encapsulación para este método en comparación con el de emulsión o/w tradicional (Kim y col., 2007). Otros inconvenientes del método son la presencia de agentes de coacervación y solvente residual en las microesferas, la agregación de las micropartículas y la dificultad para obtener microesferas de tamaño pequeño (Thomassin y col., 1996).

1.7.f Secado por atomización

La técnica de secado por atomización permite fabricar microesferas por pulverización de una solución o una dispersión líquida a través de una boquilla de atomización (Wang y Wang, 2002). Inicialmente, el polímero y la droga se disuelven en un solvente adecuado y la solución es pulverizada en forma de finas gotas en aire caliente o gas

inerte en el interior de una cámara de secado. Existen diferentes tipos de atomizadores: rotatorios, boquillas a presión y boquillas de dos fluidos (Ré, 2006; Swarbrick y Boylan, 1992). La selección de un atomizador específico depende de las propiedades de la solución polimérica y la droga, la capacidad del atomizador, el volumen de la solución y las características finales de las microesferas, entre otros factores (Ré, 2006). Además, se ha estudiado la atomización basada en vibraciones y ultrasonido (Swarbrick y Boylan, 1992). Luego de ser dispersadas, las gotas entran en contacto con una corriente caliente de gas (típicamente aire) y el solvente se evapora. La evaporación del solvente en las gotas resulta en un aumento de la concentración de polímero y, cuando se alcanza una concentración crítica, tiene lugar la transición de fase (Giunchedi y Conte, 1995). Posteriormente, las partículas secas pasan a un ciclón, donde se produce su separación bajo fuerzas centrífuga y/o gravitacional. Finalmente, las microesferas se pueden coleccionar en bolsas, filtros, depuradores o precipitadores electrostáticos para su caracterización u almacenamiento (Bowey y Neufeld, 2010). La técnica de secado por atomización es simple, rápida, presenta menor dependencia de la solubilidad del fármaco, es fácil de escalar y bajo condiciones controladas es posible obtener resultados reproducibles (Bodmeier y Chen, 1988; Masters, 1991; Sollohub y Cal, 2010). Otra ventaja es el hecho de que se evita el inconveniente relacionado con los grandes volúmenes de mezcla de solvente orgánico-agua obtenidos al final del proceso de extracción/evaporación del solvente (Wischke y Schwendeman, 2008). Sin embargo, los inconvenientes relacionados con este método son la posibilidad de degradación del fármaco debido a temperaturas elevadas, rendimientos moderados para algunos fármacos y mayores costos de equipamiento (Johansen y col., 2000; Wischke y Schwendeman, 2008).

En la Fig. 1.4 se esquematiza el proceso de obtención de microesferas para la encapsulación de drogas a partir de los métodos de extracción/evaporación de solvente, separación de fases y secado por atomización.

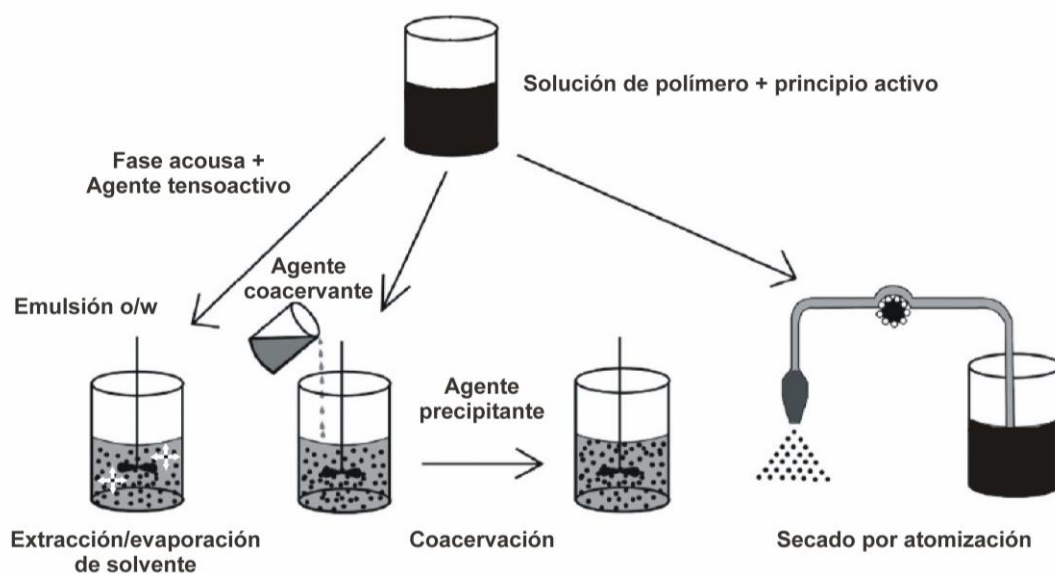


Figura 1.4: Esquema de la preparación de microesferas mediante las técnicas de extracción/evaporación de solvente, coacervación y secado por atomización.

1.7.g Microfluídica

En la formulación del fármaco, el control sobre la cinética de liberación es clave para lograr un efecto farmacocinético óptimo. Las variaciones lote a lote y la polidispersidad en tamaño y morfología de las micropartículas obtenidas a partir de los métodos de preparación convencionales pueden producir variaciones indeseables en la velocidad de degradación de las micropartículas, la estabilidad del medicamento y la cinética de liberación del mismo (Sansdrap y Moes, 1993). Además, las partículas grandes del extremo superior de la distribución de tamaños pueden provocar la formación de agregados y/o tapar una aguja tras la inyección *in vivo*. Se han desarrollado varios métodos de preparación para controlar el tamaño de las partículas (Hernandez y Mason, 2007; Friend y col., 2008), entre los cuales las tecnologías basadas en microfluídica ofrecen plataformas de bajo costo y de fácil uso para la fabricación de partículas poliméricas altamente monodispersas (Duncanson y col., 2012). La microfluídica aborda el flujo y la manipulación de pequeños volúmenes de fluido en dispositivos cuyas dimensiones se encuentran en el orden de los micrómetros (Khan y col., 2013). Los valores del número de Reynolds ($Re = \rho v l / \mu$, siendo ρ y μ la densidad y la viscosidad dinámica del fluido, respectivamente, v la velocidad de flujo, y l la dimensión característica del sistema) son a menudo pequeños ($Re \ll 1$) o moderados ($Re < 100$). El flujo es laminar, y las líneas de corriente de los fluidos pueden ser

controladas con precisión por un diseño apropiado de la geometría de los canales (Garstecki y col., 2005).

Los dispositivos de microfluídica empleados para la preparación de micropartículas pueden ser agrupados en tres categorías principales: “T-junction”, “flow focusing” y “co-flow” (Fig. 1.5). En general, la fase dispersa y la fase continua inmisible fluyen de forma independiente por un flujo a presión en microcanales. Estas dos fases se reúnen en un cruce en el cual la formación de las gotitas de la fase dispersa está dictada en gran medida por la competencia entre las tensiones de corte viscosas que actúan para deformar el líquido y la presión capilar que actúa para resistir la deformación (Gu y col., 2011).

En una configuración típica de “T-junction”, las dos fases fluyen a través de canales ortogonales y las gotitas de la fase dispersa se forman en el sitio de encuentro de ambas fases. Las gotas se generan por una combinación de las fuerzas de cizallamiento y el efecto de compresión ejercido por la fase continua cuando la fase dispersa ingresa al canal de la fase continua (Dendukuri y Doyle, 2009). El tamaño de gota no sólo depende del ancho del canal, sino que también puede ser controlado variando el gradiente de la presión de entrada o las velocidades de flujo de las fases dispersa y continua.

Los dispositivos de “flow focusing” constan de tres canales de entrada que convergen en un canal principal a través de un orificio estrecho. La fase dispersa, contenida en el canal central, es comprimida por los flujos de la fase continua a partir de dos canales laterales opuestos. Ambas fases pasan a través del pequeño orificio que se encuentra aguas abajo de los tres canales. Finalmente, la corriente de la fase dispersa se estrecha y se rompe en gotitas. La geometría “flow focusing” es más susceptible de escalar por paralelización mientras que la paralelización de la geometría “T-junction” puede conducir a procesos multimodales o caóticos, donde el tamaño de la gota no es uniforme en cada unión (Christopher y Anna, 2007).

El tercer tipo de geometría utilizado para la formación de micropartículas es la geometría “co-flow”. En esta configuración, la fase dispersa y la fase continua inmisible fluyen de forma paralela entre sí en tubos capilares concéntricos. Cuando los fluidos fluyen a bajas velocidades, se forman microgotas monodispersas de la fase continua en la punta del orificio capilar interior, en un proceso denominado de goteo. Al incrementar la velocidad de flujo del fluido más allá de cierto límite crítico, el resultado es una corriente continua del fluido disperso con formación de gotas en su extremo.

Generalmente estas gotas tienen una distribución de tamaño más amplia debido a que el punto en el que una gota se separa de la corriente continua puede variar (Shah y col., 2008).

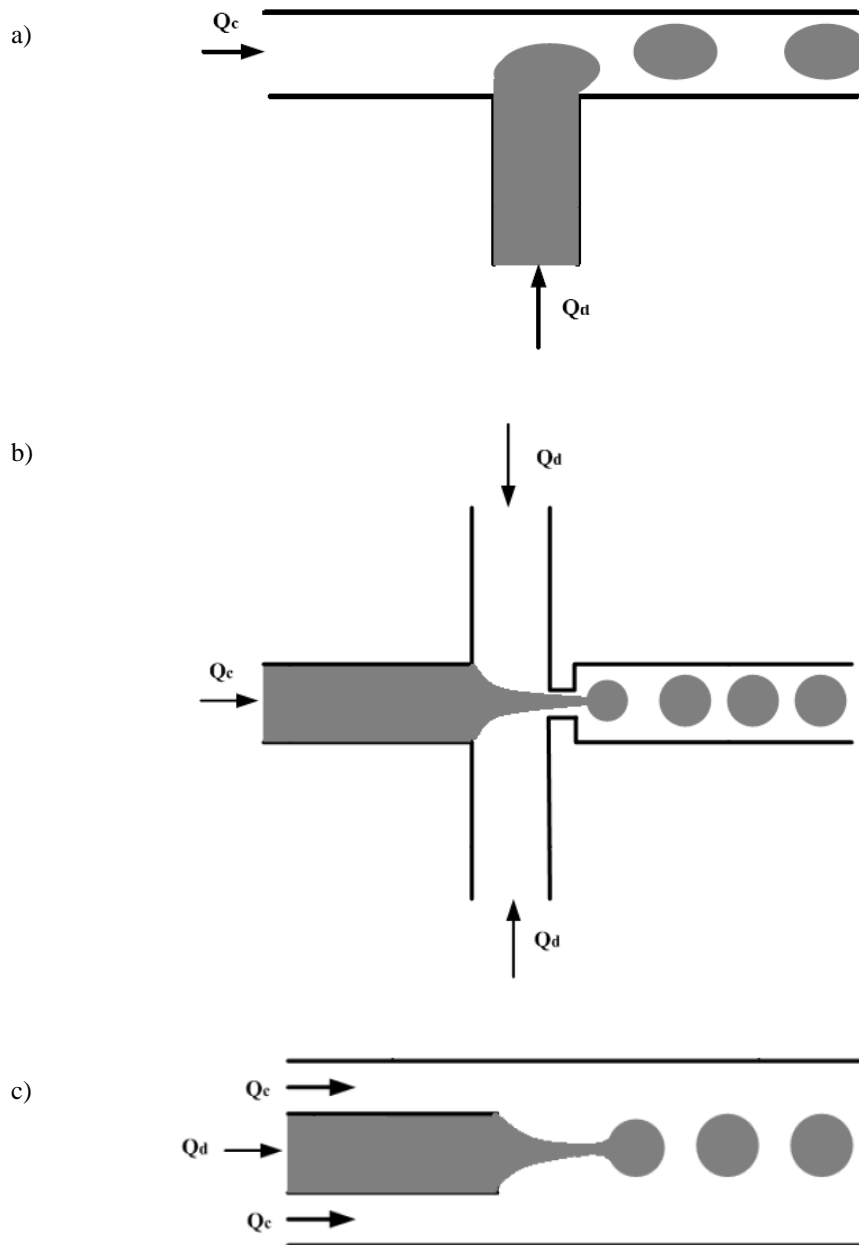


Figura 1.5: Geometrías utilizadas en dispositivos de microfluídica: a) “T-junction”; b) “flow focusing”; y c) “co-flow”.

Se han utilizado una variedad de mecanismos para convertir las gotas formadas en partículas sólidas. Estos mecanismos se pueden clasificar en: 1) métodos basados en la extracción/evaporación de solvente; 2) métodos basados en la luz; 3) métodos basados

en calor; y 4) métodos basados en reacciones químicas (Dendukuri y Doyle, 2009). En los métodos basados en la extracción/evaporación del solvente, las microgotas se convierten en partículas sólidas mediante la precipitación del polímero a causa de la eliminación del solvente orgánico. En los métodos basados en la luz, la radiación externa, tal como la luz ultravioleta, se emplea para irradiar las microgotas que contienen monómeros fotosensibles que pueden polimerizar. En los métodos basados en calor, la base para la formación de partículas es la polimerización térmica de las gotas o simplemente el uso de aceites de alto punto de fusión que pueden ser convertidos en sólidos por enfriamiento a temperatura ambiente. Los métodos basados en reacción química no requieren de ningún impulso externo para lograr la formación de partículas, sino que se adiciona por separado una especie química en el canal de microfluídica para lograr la polimerización.

Capítulo 2

Degradación hidrolítica homogénea de microesferas de PLGA

2.1 Introducción

2.1.a Poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) y sus copolímeros

El poli(ácido glicólico) (PGA), el poli(ácido láctico) (PLA) y sus diferentes copolímeros denominados poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) pertenecen a la familia de los poliésteres alifáticos y son los polímeros biodegradables sintéticos más utilizados en medicina. En la Fig. 2.1 se muestra la estructura química del PGA, del PLA y del PLGA. El creciente interés en el uso de estos polímeros en el campo farmacéutico y biomédico (Nair y Laurencin, 2007) se debe a su aprobación por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para su uso en seres humanos y animales, a su relativa facilidad de síntesis y a la posibilidad de controlar su velocidad de degradación (Pillai y Sharma, 2010).

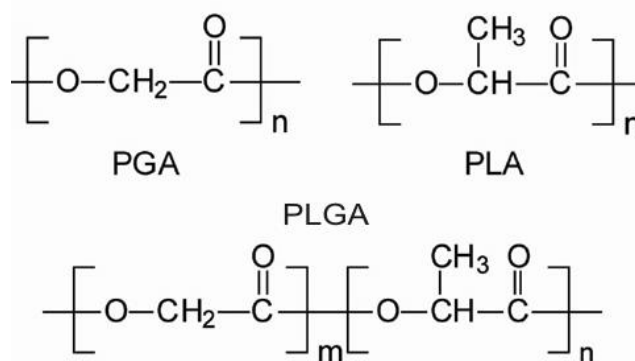


Figura 2.1: Estructuras químicas del poli(ácido glicólico) (PGA), del poli(ácido láctico) (PLA) y del poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA).

La síntesis del PLGA implica la copolimerización de los monómeros de ácido láctico (AL) y glicólico (AG). El AL es una molécula quiral que existe como dos enantiómeros, ácido L- y D-láctico, que difieren en su efecto sobre la luz polarizada. Los polímeros de PLA, PLGA y PLA pueden ser sintetizados por condensación directa, resultando en polímeros de bajo peso molecular debido a la reversibilidad de la reacción de condensación, a la presencia de reacciones de transferencia y al alto grado de conversión necesario. Por otro lado, los polímeros de alto peso molecular se sintetizan por polimerización de adición con apertura de anillo de sus dímeros cíclicos (glicólido y L- y D-lactida) (Fig. 2.2). La síntesis del PLGA se lleva a cabo generalmente con el uso de compuestos de estaño como iniciadores. Los catalizadores comúnmente utilizados en

la preparación de este polímero incluyen 2-etilhexanoato de estaño (II), alcóxidos de estaño (II), o isopropóxido de aluminio (Astete y Sabliov, 2006). Sin embargo, la eliminación completa de compuestos de estaño altamente tóxicos de los polímeros es prácticamente imposible, lo que resulta perjudicial para su aplicación en el área biomédica. Por lo tanto, se ha estudiado el empleo de iniciadores menos tóxicos, tales como lactato de zinc y de calcio y acetilacetatos de circonio (Kreiser-Saunders y Kricheldorf, 1998; Dobrzynski y col., 2001). Sólo el cloruro de zinc y el acetilacetato de circonio han permitido obtener copolímeros de pesos moleculares suficientemente altos. Dependiendo de la relación de lactida/glicólido empleada para la polimerización, se pueden obtener copolímeros con diferentes propiedades. Estos son identificados generalmente en lo que respecta a la relación de monómeros utilizada, por ejemplo, el PLGA 75:25 identifica un copolímero cuya composición es 75% de ácido láctico y 25% de ácido glicólico. Es de destacar que no existe una relación lineal entre la relación de ácido glicólico/ácido láctico y las propiedades físico-mecánicas de sus copolímeros.

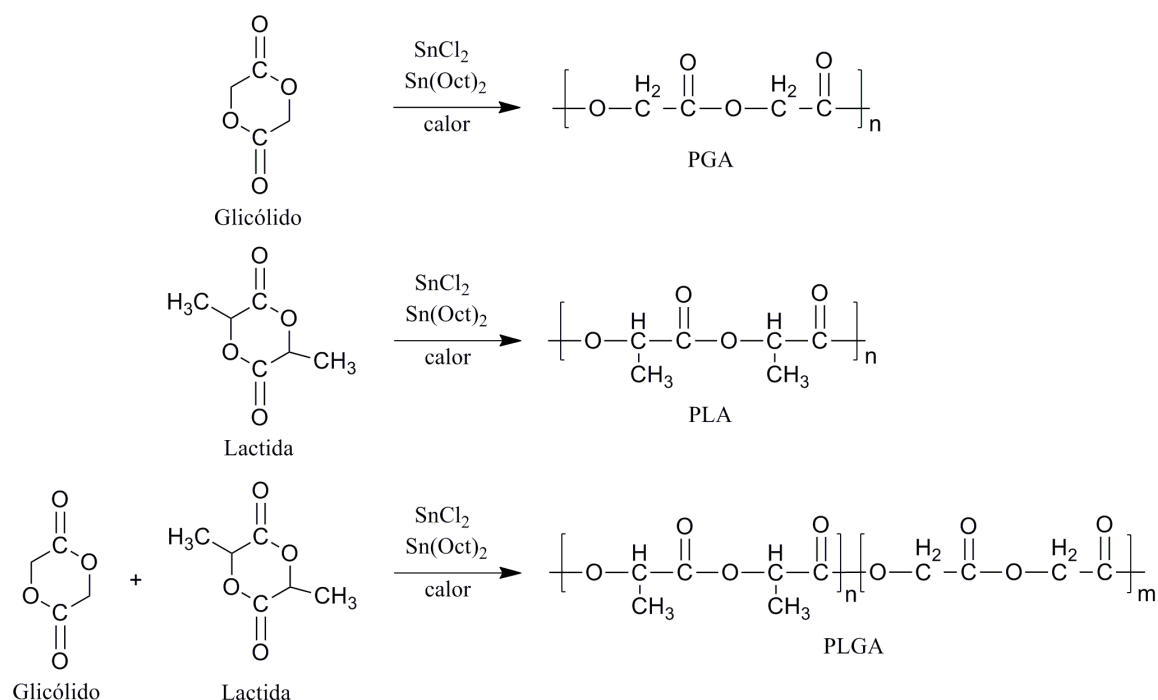


Figura 2.2: Síntesis de PGA, PLA y PLGA por polimerización por apertura de anillo.

Mientras que el PGA es altamente cristalino, la cristalinidad se pierde en el copolímero. Esto conduce a un aumento en la velocidad de hidrólisis y, por lo tanto, los copolímeros tienden a degradarse más rápidamente que el PGA o el PLA. Así, la resistencia mecánica, las propiedades de hinchamiento y la velocidad de degradación están directamente influenciadas por la cristalinidad del PLGA. El grado de cristalinidad y el punto de fusión están directamente relacionados con el peso molecular del polímero. A diferencia de los homopolímeros de AL y AG que poseen baja solubilidad en solventes orgánicos comunes, el PLGA puede ser disuelto por una amplia gama de solventes orgánicos, incluyendo solventes clorados, tetrahidrofurano, acetona u acetato de etilo (Pillai y Sharma, 2010).

2.1.b Degradación y erosión del PLGA

El control de la liberación del principio activo en sistemas basados en PLGA depende en gran medida del proceso de degradación del polímero. Por ello, resulta de interés comprender los mecanismos y los factores físicos y químicos que afectan la degradación del PLGA.

El principal mecanismo de degradación del PLGA es la hidrólisis de los enlaces éster en las cadenas de polímero (Antheunis y col., 2009). Durante la reacción de hidrólisis se produce la ruptura de las cadenas de polímero, observándose una disminución en el peso molecular. Con el tiempo, se producen moléculas de baja masa molar (oligómeros y monómero) que pueden disolverse en el medio y el sistema comienza a perder masa. Se pueden definir dos tipos de degradación dependiendo de la velocidad de difusión del agua dentro de la matriz polimérica: degradación *bulk* y degradación superficial (Fig. 2.3). Los polímeros que experimentan degradación *bulk* se degradan en todo su volumen debido a que la velocidad de penetración del agua en el polímero es más rápida que la velocidad de hidrólisis (von Burkersroda y col., 2002; Alexis, 2005). Por otro lado, en los polímeros que experimentan degradación superficial, la velocidad de hidrólisis es más rápida que la penetración del agua en el polímero, lo cual provoca que degraden principalmente en su superficie (Winzenburg y col., 2004).

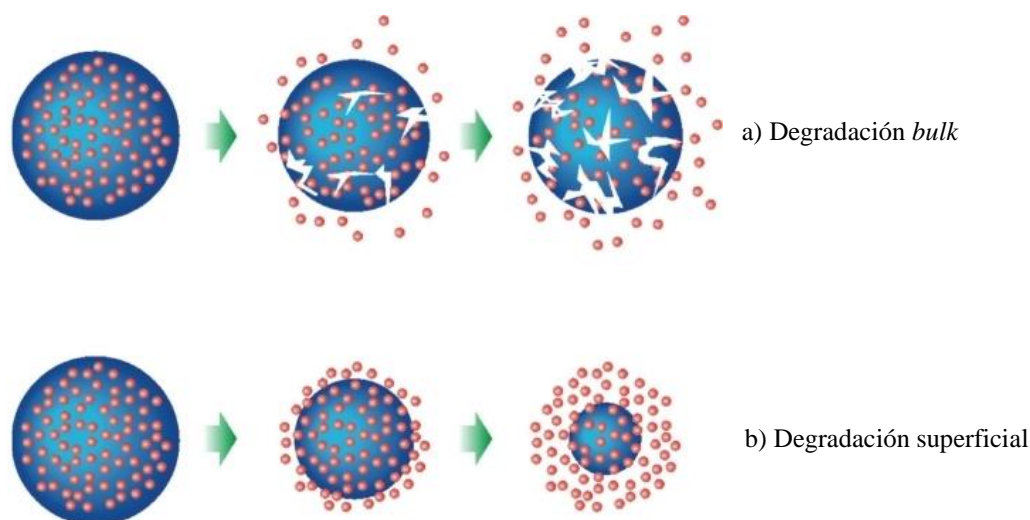


Figura 2.3: Visualización esquemática del proceso de degradación: a) *bulk* y b) superficial (Dinarvand y col., 2011).

A su vez, la degradación *bulk* puede ser de tipo homogénea o heterogénea. Los sistemas que presentan degradación *bulk* homogénea experimentan una caída gradual en el peso molecular del polímero. Las especies que alcanzan un valor crítico se solubilizan en el medio y se produce la erosión de la matriz polimérica de manera uniforme en todo su volumen. Se ha reportado que matrices poliméricas de PLGA de dimensiones pequeñas, tales como microesferas de diámetro menor a 10 μm , experimentan degradación *bulk* homogénea debido a que los productos de degradación no presentan problemas difusionales significativos (Lu y col., 1999; Park, 1995). Por otro lado, en la degradación de matrices poliméricas de mayores dimensiones se ha observado una degradación diferencial, presentando una mayor degradación en la región central del material respecto de su superficie. Este fenómeno es denominado degradación *bulk* heterogénea (Buchanan, 2008). Esta degradación diferencial entre el centro y la superficie de las matrices poliméricas se atribuye al efecto de autocatálisis de la reacción de degradación (Hurrell y Cameron, 2001). Durante la hidrólisis del polímero se generan cadenas poliméricas de bajo peso molecular con grupos terminales carboxílicos, los cuales pueden catalizar la reacción. Estos productos de degradación presentan dificultad para difundir fuera de la matriz, por lo que permanecen atrapados dentro de la misma (Dunne y col., 2000). Como consecuencia, la concentración de grupos ácidos terminales aumenta rápidamente y el ambiente se torna altamente ácido, provocando la autocatálisis de la reacción de degradación (Antheunis y col., 2010; Han y col., 2011; Alexis y col., 2006). Cuando la hidrólisis se produce en la superficie del

material, los productos de degradación pueden difundir más fácilmente y debido a que esta capa superficial presenta un mayor contenido de solución con capacidad *buffer*, se produce la neutralización de los grupos ácidos generados (Schmitt y col., 1993; Wang y col., 1990). Estos efectos combinados dan lugar a un entorno menos ácido y, por lo tanto, la reacción de autocatálisis es menos significativa en la superficie del material.

2.1.c Factores que afectan la degradación de matrices de PLGA

Se ha demostrado que la velocidad de degradación del PLGA se ve influenciada por diversos factores, tales como la composición del copolímero, el peso molecular, el grado de cristalinidad, la naturaleza de los grupos terminales y la temperatura, entre otros (Mehta y col., 1996; De Jong y col., 2001; Siepmann y col., 2005; Shameem y col., 1999; Park, 1994; Park, 1995; Grayson y col., 2005; Dunne y col., 2000; Astete y Sabliov, 2006).

La vida media del PLGA se incrementa a medida que aumenta la cantidad relativa de cada tipo de monómero debido a que el polímero puede cristalizar más fácilmente con menores niveles de copolimerización (Fig. 2.4). El copolímero con una relación de monómeros 50:50 presenta la mayor velocidad de degradación debido a que este copolímero es altamente amorfo. Además, la vida media del PLGA es menor al incrementar la proporción de monómeros de AG por la mayor hidrofiliicidad y velocidad de hidrólisis de los enlaces de AG (Hakkarainen y col., 1996).

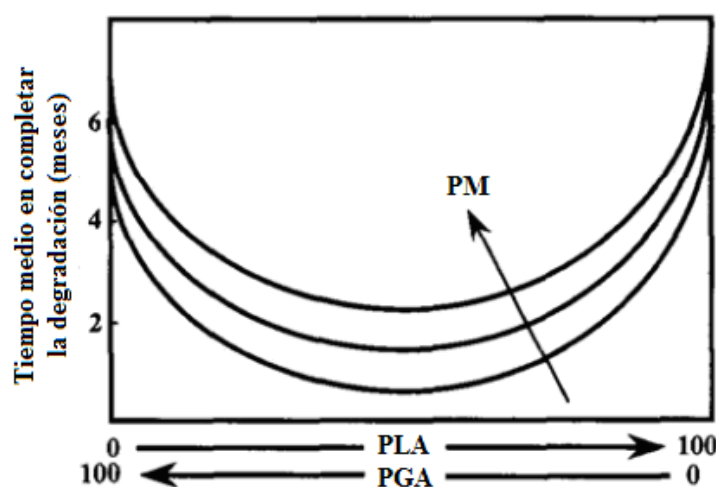


Figura 2.4: Perfiles de degradación *in vivo* de PLGA

La cristalinidad tiene un efecto significativo sobre la velocidad de degradación, ya que determina la facilidad con que las moléculas de agua pueden acceder a los enlaces éster y provocar su hidrólisis. Las regiones amorfas son más accesibles por las moléculas de agua que las regiones cristalinas, lo cual aumenta la velocidad de hidrólisis y la degradación de las cadenas de polímero (Hakkarainen y col., 1996).

El peso molecular del polímero también afecta la velocidad de degradación. Se ha reportado una degradación más rápida del PLGA con la disminución del peso molecular inicial (Alexis, 2005). Esto se atribuye a un aumento en el volumen libre y en el número de grupos ácidos terminales libres (Zhu y col., 1991; Park, 1995).

La degradación del PLGA también es influenciada por el pH del medio. Se ha reportado que el PLGA se degrada más lentamente en medio básico en comparación con medios ácido y neutro (Wu y Wang, 2001). Sin embargo, otros autores han reportado que se la degradación del PLGA es catalizada tanto en medio ácido como en medio alcalino (Wang y col., 1998).

Para el caso de copolímeros de PLGA de igual composición y peso molecular, se ha demostrado que la degradación puede verse afectada por la presencia y la naturaleza química de los grupos terminales (Gasper y col., 1998; Zambaux y col., 1998). Se ha indicado que las micropartículas de PLGA con extremos terminales ácidos se degradan 2-3 veces más rápido *in vitro* y 3-4 veces más rápido *in vivo* en comparación con aquellas de PLGA que poseen extremos terminales protegidos con cadenas alifáticas, probablemente debido a la mayor hidrofilicidad del polímero sin extremo protegido y al efecto de autocatálisis.

Para reducir el riesgo de infección y complicaciones asociadas, es necesario esterilizar todos los implantes médicos después de la fabricación y antes de su colocación quirúrgica. Las técnicas de esterilización más comunes utilizan calor, vapor, radiación, o una combinación de estos métodos. El PLGA, además de ser susceptible a la humedad y la radiación, es sensible al calor. Por lo tanto, la selección de la técnica de esterilización correcta es de crucial importancia para su desempeño físico y mecánico *in vivo*.

Algunos principios sobre el proceso de degradación se encuentran aún en discusión. Se ha reportado que la hidrólisis de los enlaces éster se produce en forma aleatoria, es decir, los tres tipos de enlaces éster que posee el PLGA (AG-AG, AL-AL, AL-AG) tienen igual probabilidad de ser atacados por las moléculas de agua (Hausberger y col., 1995). Por otro lado, otros autores sugieren que bajo condiciones extremas de

degradación (pH bajo, alta temperatura o radiación electromagnética), la escisión de los enlaces éster sólo se produce a partir de los extremos de las cadenas poliméricas (Shih, 1995).

2.1.d Modelos matemáticos para la degradación del PLGA

Se han propuesto varios modelos cinéticos para la degradación de matrices de PLA y PLGA (Ford Versypt y col., 2013), incluyendo cinéticas de pseudo-primer orden (Raman y col., 2005; Sansdrap y Moes, 1997; Siepmann y col., 2005), cinéticas de orden 2,5 con disociación parcial de los grupos COOH (Lyu y col., 2007), y cinéticas de orden cuadrático (Han y Pan, 2011; Antheunis y col., 2009; Antheunis y col., 2010; Nishida y col., 2000; Siparsky y col., 1998). Nishida y col. (2000) utilizaron el análisis de momentos para predecir la evolución de los pesos moleculares medios de poliésteres alifáticos considerando hidrólisis autocatalítica aleatoria. El modelo es capaz de predecir con precisión la hidrólisis de películas de poliésteres alifáticos. Wang y col. (2008) desarrollaron un modelo fenomenológico para la degradación de platos de PLA de diferentes espesores basado en un conjunto de ecuaciones de difusión-reacción simplificadas. El modelo considera la reacción de hidrólisis y la difusión de monómeros, y es capaz de predecir la disminución del peso molecular promedio en peso del sistema. Han y Pan (2009) ampliaron el modelo de Wang y col. (2008) con el fin de incluir la interacción entre el grado de cristalización y la reacción de hidrólisis durante la degradación. El modelo simula las evoluciones de peso molecular, grado de cristalinidad y pérdida de masa de películas biodegradables. Soares y Zunino (2010) propusieron un modelo mixto para describir la degradación *bulk* y superficial de polímeros biodegradables resolviendo un sistema de ecuaciones de reacción-difusión. Antheunis y col. (2009) propusieron un modelo cinético basado en la hidrólisis autocatalítica de cilindros de poliésteres alifáticos. El modelo es capaz de describir la disminución de los pesos moleculares medios de una manera precisa y también de predecir razonablemente la tendencia de pérdida de masa del dispositivo a través de ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas. El modelo fue simplificado para predecir la evolución del peso molecular promedio en número de poliésteres alifáticos sin la necesidad de cálculos complicados y de excesivos parámetros de entrada (Antheunis y col., 2010). Chen y col. (2011) desarrollaron un modelo matemático de erosión *bulk* que permite la predicción de la evolución temporal del peso molecular promedio y estima la pérdida de masa para dispositivos de diversas geometrías. Este modelo considera la

autocatálisis y la difusión de monómeros con una difusividad dependiente de la degradación. Casalini y col. (2014) describieron la degradación de micropartículas de PLGA a través de ecuaciones de conservación de masa para las diferentes especies. El modelo tiene en cuenta la difusión de oligómeros y los efectos autocatalíticos, y es capaz de predecir la disminución de pesos moleculares medios para micropartículas de diferentes tamaños.

En el presente capítulo se formula un modelo matemático que permite predecir la degradación hidrolítica homogénea de microesferas de PLGA. El modelo tiene en cuenta el efecto autocatalítico de los grupos carboxílicos terminales y la composición del polímero sobre la velocidad de degradación de la matriz polimérica. Se basa en un mecanismo cinético detallado que considera la hidrólisis de los diferentes tipos de enlaces éster en el copolímero por escisión de cadena aleatoria. El modelo permite estimar las evoluciones de los pesos moleculares medios, la pérdida de masa, las concentraciones de enlaces éster y los perfiles de pH a lo largo del proceso de degradación. El modelo fue ajustado y validado con datos experimentales reportados. Los resultados obtenidos en este capítulo fueron publicados en una revista científica internacional [Busatto y col. (2016), “Homogeneous hydrolytic degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: mathematical modeling”, *Polymer Degradation and Stability* 125, 12–20].

2.2 Experimentos simulados

2.2.a Experimentos de degradación de Blanco y col. (2006)

Los experimentos realizados por Blanco y col. (2006) fueron considerados para el ajuste y validación del modelo. El trabajo experimental consistió en la degradación *in vitro* de microesferas de PLA, PLGA 50/50 y PLGA 75/25 (Exps. 1, 2 y 3, respectivamente) preparadas por el método de secado por atomización. Para cada muestra de polímero se prepararon tubos de ensayo de polietileno conteniendo 40 mg de microesferas y 3 mL de buffer fosfato salino (1 mM, pH 7,4) y se incubaron en la oscuridad a 37 °C. Los tubos de ensayo se agitaron una vez al día durante 1 min en un vórtex. A intervalos de tiempo apropiados, se removió la solución buffer y la muestra de polímero se secó bajo vacío. El tiempo máximo de incubación fue de 5 meses.

2.2.b Experimentos de degradación de Mariano (2012)

Para la validación del modelo se consideraron adicionalmente los resultados experimentales obtenidos en Mariano (2012). El trabajo experimental consistió en la degradación *in vitro* de microesferas de PLGA 50/50 (Exp. 4) preparadas por el método de extracción/evaporación de solvente. Para cada muestra de polímero se prepararon viales de vidrio conteniendo aproximadamente 65 mg de microesferas y 10 mL de agua ultrapura, y se incubaron a 37 °C bajo agitación orbital a 50 rpm. A intervalos de tiempo apropiados, las microesferas se separaron del medio de degradación por centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos y la muestra de polímero se secó bajo vacío hasta peso constante.

2.3 Resultados y discusión

2.3.a Experimentos de degradación de Blanco y col. (2006)

Los valores de pesos moleculares medios y pérdida de masa a lo largo del proceso de degradación se presentan en la Tabla 2.1 y en las Figs. 2.5 y 2.6. A partir de los pesos moleculares medios de la Tabla 2.1 y la composición del copolímero, se calculó la evolución de la concentración de enlaces éster considerando una distribución de enlaces aleatoria. Estos resultados se muestran en la Fig. 2.5c.

Tabla 2.1: Degradación de microesferas de PLA y PLGA (Blanco y col., 2006)

Tiempo (días)	Exp. 1 PLA			Exp. 2 PLGA 50/50			Exp. 3 PLGA 75/25		
	M_n ($\times 10^3$)	M_w ($\times 10^3$)	Masa (%)	M_n ($\times 10^3$)	M_w ($\times 10^3$)	Masa (%)	M_n ($\times 10^3$)	M_w ($\times 10^3$)	Masa (%)
0	25,4	42,6	100	24,2	38,8	100	39,8	65,4	100
1	25,4	42,0	100	23,9	38,2	100	39,7	64,2	100
5	25,2	41,6	100	22,1	36,6	100	-	-	-
9	24,3	40,4	100	21,3	35,4	100	39,5	64,4	100
14	-	-	-	20,2	34,6	100	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	38,2	59,2	100
19	24,0	40,2	100	18,7	30,3	100	-	-	-
22	-	-	-	17,1	26,9	100	-	-	-
25	23,5	39,8	100	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	11,6	19,3	100	33,0	52,3	100
35	23,3	39,5	100	5,4	8,1	97	31,2	50,3	100
42	-	-	-	3,2	4,9	90	-	-	-
45	22,5	38,8	100	-	-	-	29,1	45,4	100
49	-	-	-	1,8	2,3	83	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-	27,1	44,4	100
56	-	-	-	1,4	1,7	57	-	-	-
58	22,3	39,9	100	-	-	-	-	-	-
71	21,3	36,7	100	1,1	1,2	18	20,8	34,0	100
78	-	-	-	1,0	1,1	15	-	-	-
84	21,0	36,2	100	-	-	-	16,0	25,8	100
96	20,8	35,7	100	-	-	-	10,6	17,4	100
109	20,0	34,7	100	-	-	-	6,2	9,2	86
126	19,6	33,9	100	-	-	-	2,0	2,1	73
144	18,9	32,1	100	-	-	-	1,1	1,2	47

Los datos experimentales de la degradación de microesferas de PLA y PLGA realizados por Blanco y col. (2006) corresponden a microesferas que poseen un

diámetro medio inferior a 10 μm , para las cuales se ha reportado que el fenómeno de difusión de los productos de degradación es despreciable (Grizzi y col., 1995).

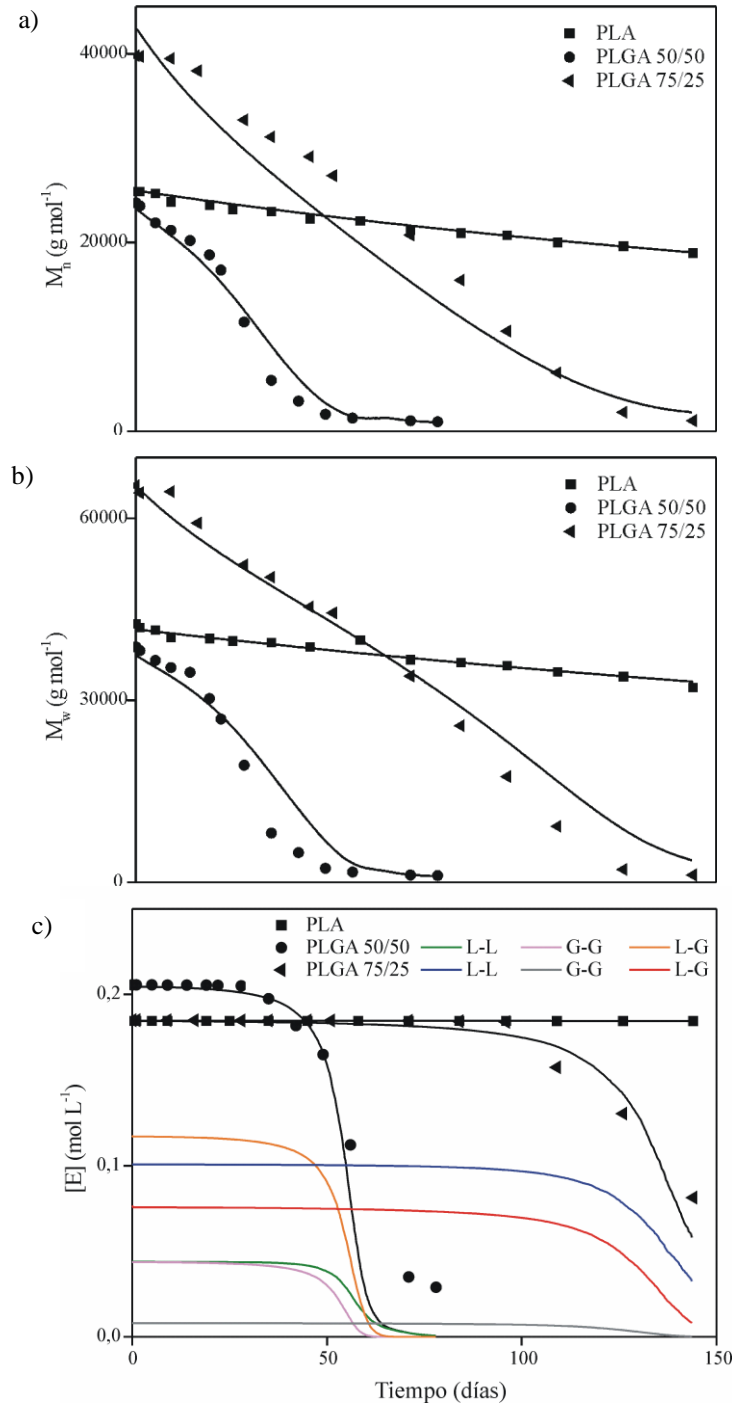


Figura 2.5: a), b) Evolución de los pesos moleculares medios (\bar{M}_n y \bar{M}_w) para los Exps. 1-3; y c) Evolución de las concentraciones de enlaces éster para los Exps. 1-3. (Datos experimentales en símbolos y resultados de simulación en líneas continuas).

Como es de esperar, en todos los experimentos se observa una disminución en los pesos moleculares medios del polímero con el transcurso de la degradación. Los perfiles de degradación observados en las Exp. 2 y 3 (Figs. 2.5 y 2.6) indican que la degradación se produce a través de un proceso de degradación *bulk*. Existe un período inicial sin pérdida de masa en el cual el peso molecular del polímero disminuye, es decir, la escisión de las cadenas de polímero tiene lugar en toda la muestra. Los perfiles de pesos moleculares medios durante la degradación muestran una curva típica que puede dividirse en tres etapas (Fig. 2.5). En la primera etapa, la disminución en el peso molecular es lenta debido a la baja concentración de grupos carboxílicos. En la segunda etapa, el incremento del número de grupos terminales ácidos acelera la reacción de hidrólisis y, por lo tanto, la disminución del peso molecular. En la última etapa, las bajas concentraciones de enlaces éster retrasan la degradación.

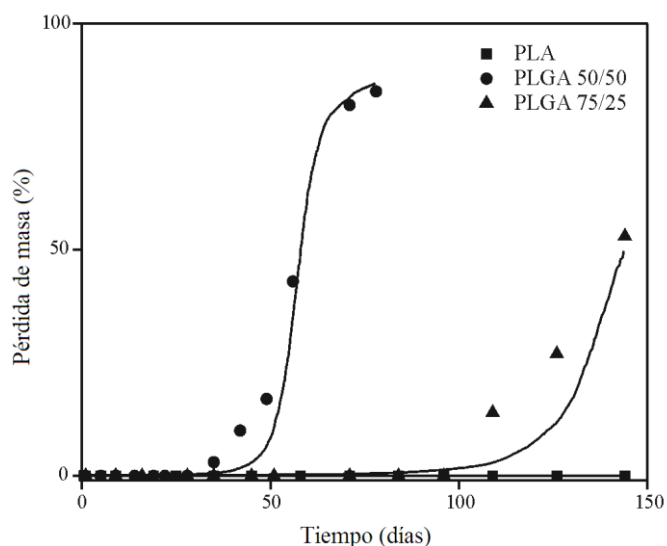


Figura 2.6: Evolución de la pérdida de masa para los Exps. 1-3. (Datos experimentales en símbolos y resultados de simulación en líneas continuas).

En el Exp. 1, la velocidad de degradación del PLA es muy lenta y la pérdida de masa puede considerarse despreciable en el tiempo estudiado (Fig. 2.6). Esto es debido a que los productos de degradación no alcanzan el valor de peso molecular necesario para disolverse en el medio de degradación. La menor velocidad de degradación observada para el PLA se debe a la hidrofobicidad del AL y a la mayor capacidad de cristalizar del polímero.

2.3.b Experimentos de degradación de Mariano (2012)

La Fig. 2.7 muestra una micrografía obtenida por SEM de las micropartículas de PLGA. Como se puede observar, las partículas resultaron esféricas, no presentan agregados y su superficie es lisa. El diámetro medio de partícula fue de $3,4 \pm 0,79 \mu\text{m}$.

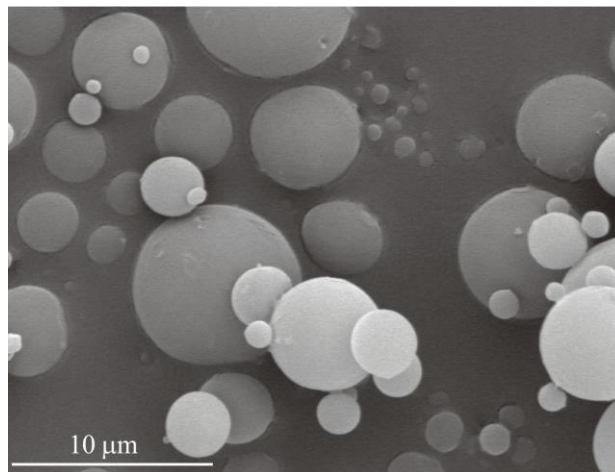


Figura 2.7. Micrografía electrónica de barrido de las microesferas de PLGA.

Los resultados experimentales de degradación de las microesferas de PLGA se muestran en la Tabla 2.2 y en las Figs. 2.8 y 2.9. A partir de la evolución de los pesos moleculares medios de la Tabla 2.2 se estimó la evolución experimental de las concentraciones de enlaces éster considerando la composición del copolímero y distribución aleatoria de enlaces (Fig. 2.8b).

Tabla 2.2: Datos experimentales de la degradación de microesferas de PLGA.

Exp. 4 PLGA 50/50				
Tiempo (días)	M_n	M_w	Masa (%)	pH
0	2355,4	6787,4	100	5,25
1	2374,8	6397	95,64	5,24
3	1943,2	5157,5	90,87	5,14
5	1648,4	3691,5	89,51	4,47
7	1725	3410,3	88,07	4,08
9	1255,1	2660,6	81,37	3,72

La Fig. 2.8 presenta la evolución de los pesos moleculares medios del polímero. Se observa una rápida disminución de los pesos moleculares desde el inicio del experimento debido al bajo peso molecular inicial del polímero, lo cual provoca un rápido incremento de la concentración de grupos ácidos que pueden catalizar la reacción de hidrólisis de los enlaces éster en el copolímero.

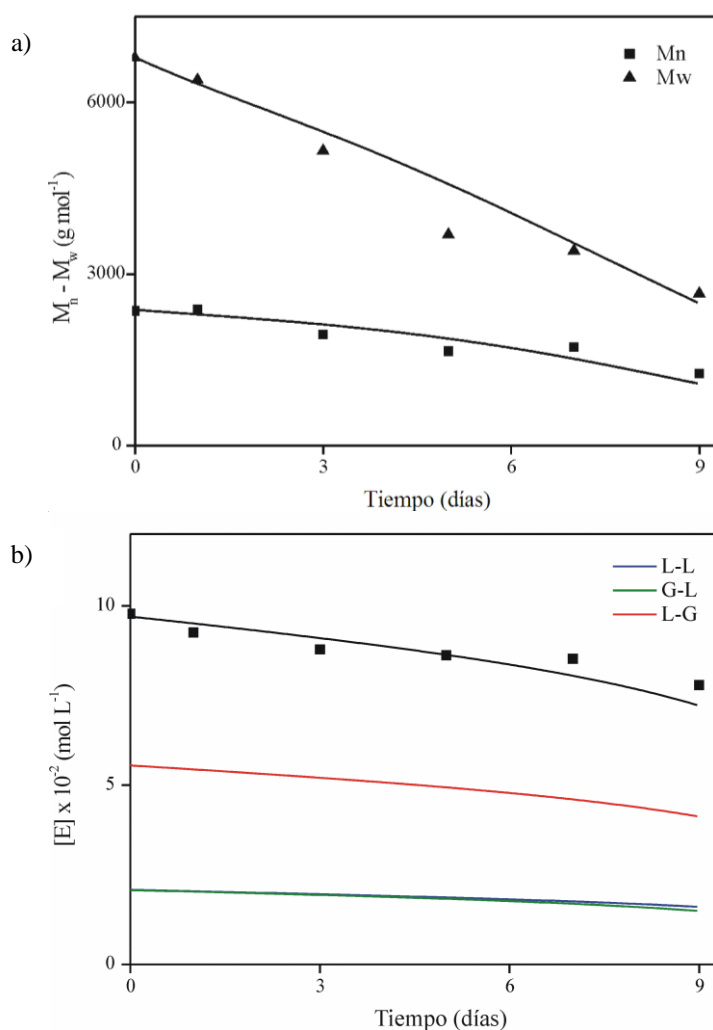


Figura 2.8: a) Evolución de los pesos moleculares medios (\bar{M}_n y \bar{M}_w) para el Exp. 4; y b) Evolución de la concentración de enlaces éster para el Exp. 4. (Datos experimentales en símbolos y resultados de simulación en líneas continuas).

En la Fig. 2.9a se muestra la pérdida de masa a lo largo del proceso de degradación. Cuando el peso molecular de los oligómeros es suficientemente bajo, el sistema comienza a perder masa debido a la disolución de los oligómeros en el medio (Park, 1995). En este caso, se observa pérdida de masa desde el comienzo del experimento y

presenta un perfil similar al de pesos moleculares. Estos resultados indican que los productos de degradación alcanzan rápidamente el peso molecular necesario para disolverse en el medio debido a que el polímero presenta un bajo peso molecular inicial.

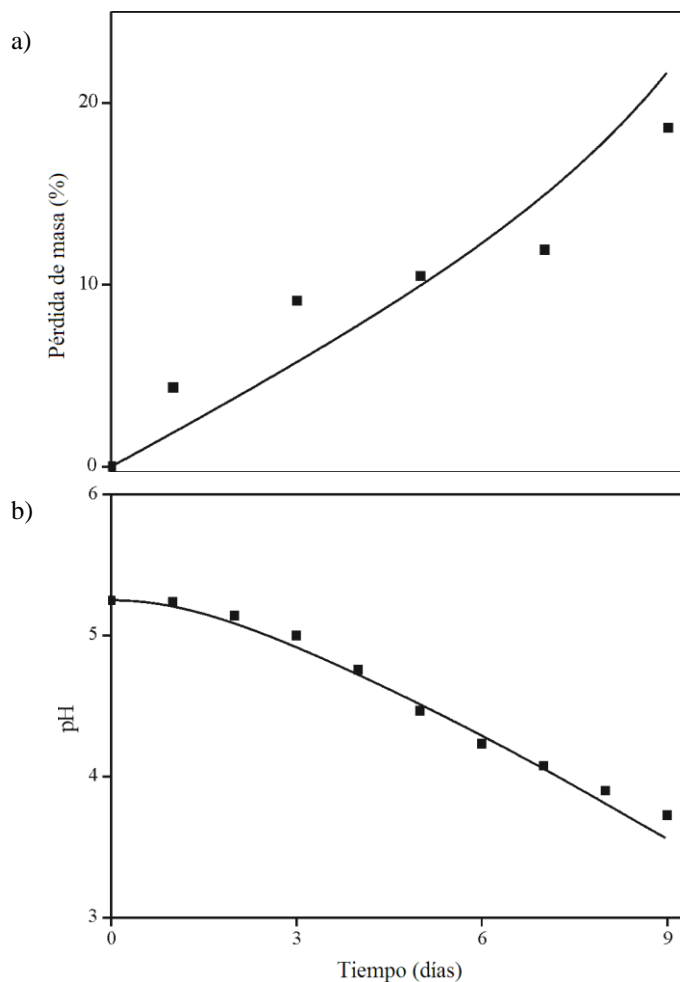


Figura 2.9: a) Evolución de la pérdida de masa para el Exp. 4; y b) Evolución del pH para el Exp. 4. (Datos experimentales en símbolos y resultados de simulación en líneas continuas).

La Fig. 2.9b muestra la evolución temporal del pH en el medio de degradación. La disminución del pH se debe a la generación de productos de degradación con grupos carboxílicos terminales que poseen un alto grado de disociación y acidifican rápidamente el medio. La disminución del pH tiene lugar de manera casi inmediata al inicio del experimento, en concordancia con el perfil de pesos moleculares medios y pérdida de masa.

2.4 Modelo matemático

El modelo matemático permite describir y predecir la degradación hidrolítica homogénea de microesferas de PLGA considerando el efecto autocatalítico de los grupos carboxílicos terminales. Las ecuaciones generales para la hidrólisis autocatalizada de los enlaces éster se expresan a continuación:

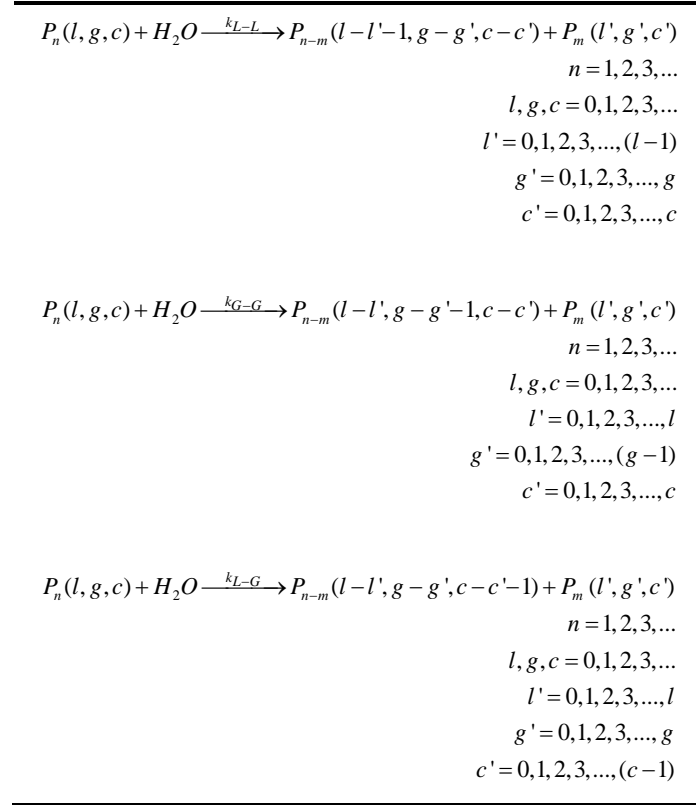


donde E representa un enlace éster y $COOH$ y OH representan a los grupos terminales ácido y alcohol, respectivamente.

Con el fin de tener en cuenta la degradabilidad de cada tipo de enlace éster, a partir de la Ec. (1) se extiende el mecanismo de hidrólisis detallado del Esquema 2.1. Las especies de polímeros se caracterizan por su longitud de cadena y por el número de cada tipo de enlace éster. Se adoptó la siguiente nomenclatura: $P_n(l, g, c)$ representa una cadena polimérica de longitud n con l , g y c enlaces éster Láctico-Láctico (L-L), Glicólico-Glicólico (G-G) y Láctico-Glicólico (L-G), respectivamente; y k_{L-L} , k_{G-G} y k_{L-G} representan a las constantes de hidrólisis correspondientes a los enlaces éster L-L, G-G y L-G, respectivamente.

Sobre la base del mecanismo detallado de hidrólisis se deriva el modelo matemático para la degradación. El modelo consta de las Eqs. (A.1-15) del Apéndice A y permite predecir las evoluciones de distribuciones de pesos moleculares y pesos moleculares medios, así como también las concentraciones de enlaces éster, los perfiles de pérdida de masa y de pH. El modelo adopta las siguientes hipótesis: i) las constantes de hidrólisis son independientes de la longitud de la cadena; ii) los enlaces éster se distribuyen uniformemente en la cadena de polímero; iii) todas las partículas tienen el mismo tamaño (igual a su diámetro medio); iv) los polímeros son amorfos; y v) se considera la disolución de oligómeros con una longitud de cadena menor a n_s . Notar que para los sistemas homogéneos, se asume que el pH en el interior de las microesferas es uniforme.

Esquema 2.1: Mecanismo de hidrólisis detallado de la degradación de microesferas de PLGA.



2.5 Resultados de las simulaciones y discusión

El programa de computación fue escrito en Matlab R2012a. El modelo consiste en un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias que fue resuelto mediante el método de Euler. El tiempo de una simulación típica en un procesador Intel® Core 2 Duo fue del orden de 30 s.

En las Figs. 2.5 y 2.6 se comparan los resultados experimentales y teóricos para los Exps. 1-3. Las predicciones obtenidas presentan una muy buena concordancia con los resultados experimentales. La constante de hidrólisis k_{L-L} se estimó a partir de los datos del Exp. 1 y las constantes de hidrólisis k_{G-G} y k_{L-G} se estimaron a partir de los datos del Exp. 2, considerando que k_{L-G} es un valor medio entre k_{L-L} y k_{G-G} . Las constantes de disociación ácidas directa (k_{a1}) e inversa (k_{a2}) se encuentran relacionadas por la constante de equilibrio de disociación de los grupos carboxílicos. Las constantes cinéticas estimadas se detallan en la Tabla 2.3. Los resultados indican que la velocidad de escisión de los enlaces G-G es más rápida que la de los enlaces L-L, lo cual se encuentra en acuerdo con observaciones experimentales (Hakkarainen *et. al*, 1996; Vey y col., 2008). En la Fig. 2.5 se puede observar que para el PLGA 50/50, el peso

molecular disminuye más rápidamente en comparación con el PLGA 75/25 y el PLA. El valor estimado de la longitud de la cadena con la que los oligómeros pueden disolverse en el medio (n_s) fue de 10 unidades repetitivas, en concordancia con los datos reportados para el PLA y el PLGA en condiciones experimentales similares (Antheunis y col., 2009; Schliecker y col., 2003).

En las Figs. 2.8 y 2.9 se presentan los resultados experimentales y teóricos para el Exp. 4. Las predicciones obtenidas presentan buena concordancia con los resultados experimentales. Las constantes cinéticas estimadas se detallan en la Tabla 2.3. Los resultados muestran que la degradación del polímero en medio acuoso es más rápida que en solución *buffer*. Además, el peso molecular inicial del polímero fue menor. Esto se puede atribuir a la rápida generación de un ambiente ácido que cataliza la hidrólisis de los enlaces éster del polímero.

Tabla 2.3: Constantes cinéticas de los Exps. 1-4.

Exps. 1-3					
k_{L-L} ($L \text{ mol}^{-1} s^{-1}$)	k_{G-G} ($L \text{ mol}^{-1} s^{-1}$)	k_{L-G} ($L \text{ mol}^{-1} s^{-1}$)	k_d ($m^{-2} s^{-1}$)	k_{a1} (s^{-1})	k_{a2} (s^{-1})
$7,87 \times 10^{-4}$	$8,34 \times 10^{-3}$	$4,57 \times 10^{-3}$	$1,04 \times 10^{-15}$	$2,08 \times 10^{-12}$	$6,01 \times 10^{-9}$
Exp. 4					
k_{L-L} ($L \text{ mol}^{-1} s^{-1}$)	k_{G-G} ($L \text{ mol}^{-1} s^{-1}$)	k_{L-G} ($L \text{ mol}^{-1} s^{-1}$)	k_d ($m^{-2} s^{-1}$)	k_{a1} (s^{-1})	k_{a2} (s^{-1})
$7,87 \times 10^{-4}$	$6,03 \times 10^{-3}$	$3,41 \times 10^{-3}$	$2,31 \times 10^{-25}$	$2,78 \times 10^{-20}$	$8,22 \times 10^{-17}$

Otras predicciones teóricas se presentan en las Figs. 2.10-12. En la Fig. 2.10 se muestran las evoluciones de pH simuladas para los Exps. 1-3. En el caso de la degradación del PLA, el pH se mantiene prácticamente constante durante el experimento debido a la baja velocidad de degradación, mientras que para los copolímeros se observó una disminución pronunciada. La disminución del pH fue mayor para el PLGA 50/50 como consecuencia de la mayor velocidad de degradación.

La Fig. 2.11 muestra el tiempo medio de degradación predicho en función de la composición del copolímero. El tiempo medio de degradación se define como el tiempo necesario para que la masa del polímero se reduzca a la mitad. Dicho valor aumenta a medida que se incrementa el contenido de AL en el copolímero debido a que los enlaces L-L se degradan más lentamente que los enlaces G-G. Se puede observar que este efecto

se predijo con exactitud por el modelo. Además, el tiempo medio de degradación se incrementa con el aumento del peso molecular inicial del copolímero.

Las evoluciones teóricas de las distribuciones de pesos moleculares (DPM) para los Exps. 1-4 se muestran en las Figs. 2.12-13. Las DPM iniciales de los Exps. 1-3 se estimaron a partir de los pesos moleculares medios reportados. Como se muestra en la Fig. 2.12, las DPM se desplazan hacia pesos moleculares más bajos con el transcurso de la degradación. Este cambio fue más lento para el PLA y aumenta con el contenido de AG en el caso de los copolímeros.

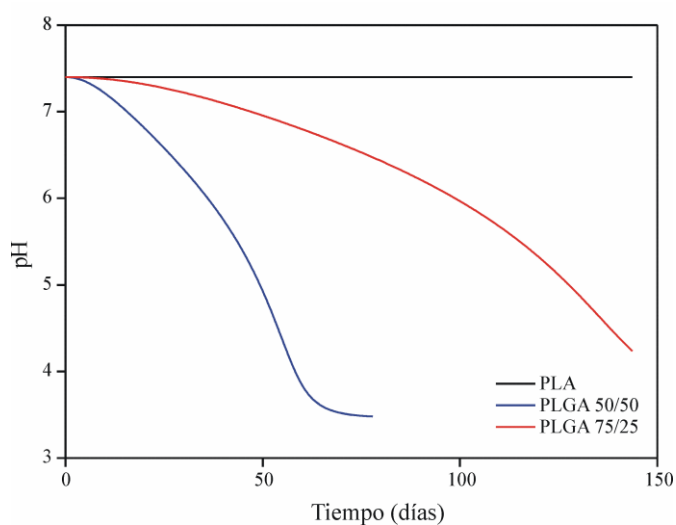


Figura 2.10. Evolución simulada del pH para los Exps. 1-3.

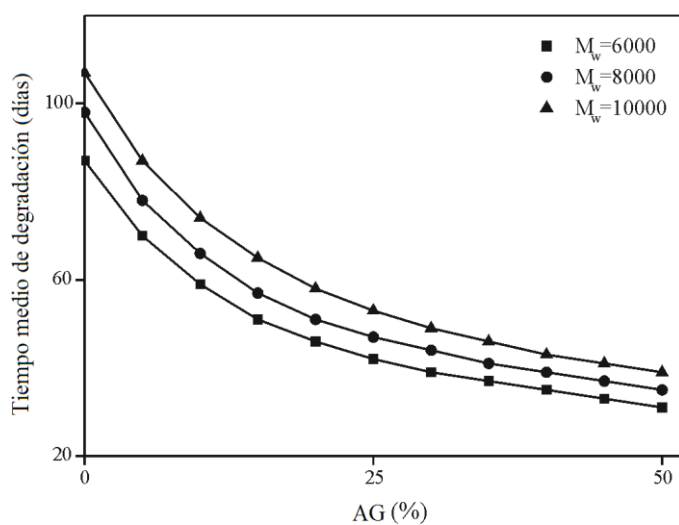


Figura 2.11: Predicción del tiempo medio de degradación en función de la composición del copolímero y del peso molecular.

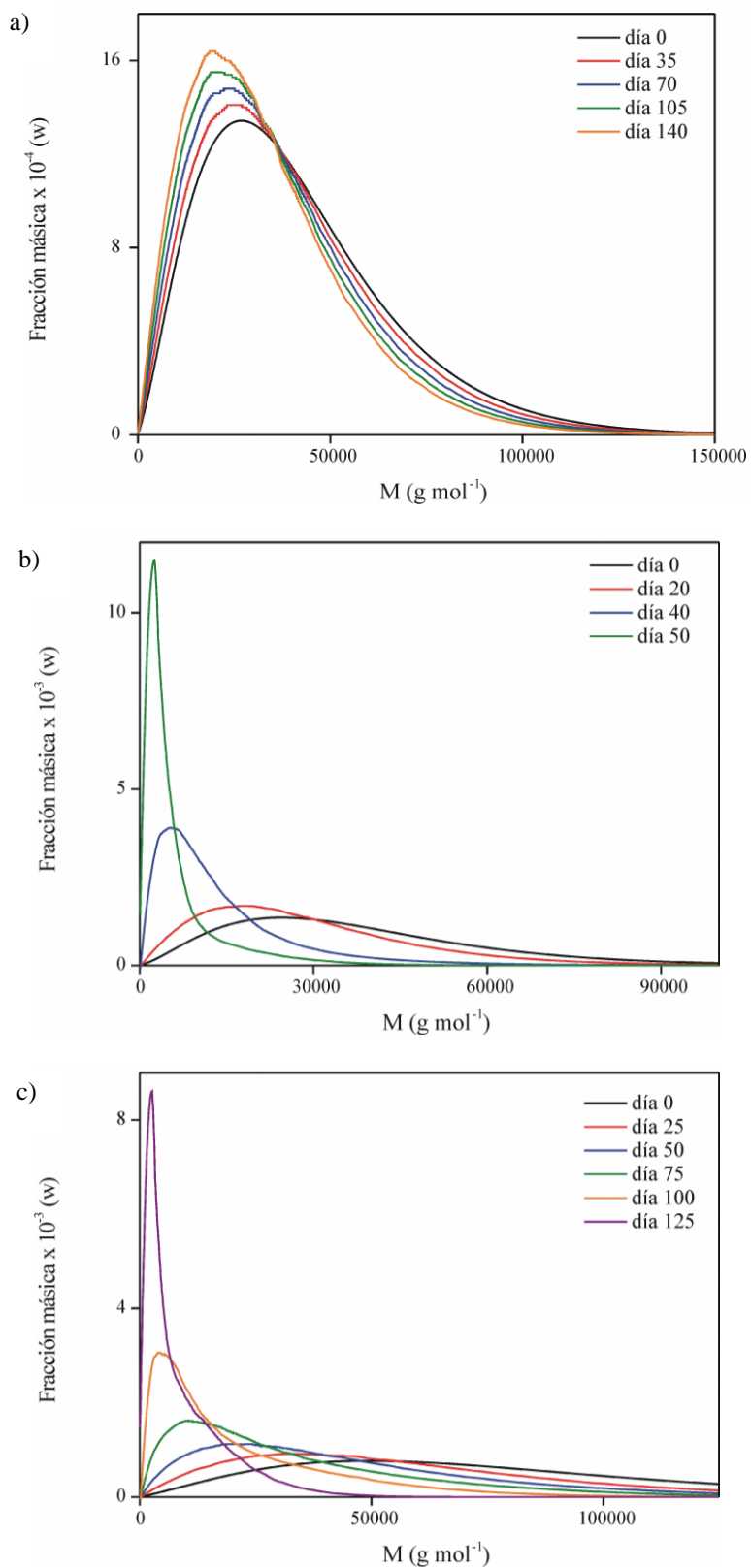


Figura 2.12: Distribuciones de pesos moleculares simuladas: a) Exp. 1; b) Exp. 2; y c) Exp. 3.

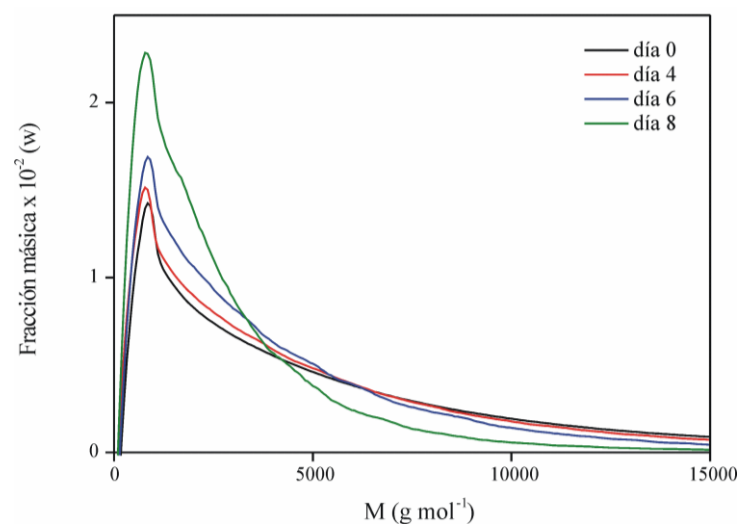


Figura 2.13: Distribuciones de pesos moleculares simuladas para el Exp. 4.

2.6 Conclusiones

Se desarrolló un modelo matemático para predecir la degradación hidrolítica homogénea de microesferas de PLGA. El modelo permite estimar las evoluciones de los pesos moleculares medios, la pérdida de masa, las concentraciones de enlaces éster y el perfil de pH durante el proceso de degradación. El modelo fue ajustado y validado con datos experimentales reportados y datos experimentales nuevos de degradación homogénea de microesferas de PLGA. Los resultados teóricos presentan un muy buen acuerdo con las mediciones experimentales. El medio de incubación afectó a la degradación de las microesferas, siendo la degradación más rápida en un medio acuoso en comparación con un medio con capacidad *buffer*. El modelo predice con precisión el efecto de la composición del copolímero y el peso molecular sobre la velocidad de degradación de la matriz polimérica y se puede emplear para seleccionar una composición y/o peso molecular óptimo con el fin de lograr un tiempo de degradación deseado. En capítulos posteriores el modelo se extenderá a sistemas heterogéneos para predecir los perfiles de pH dentro de las partículas y la evolución de la morfología de las partículas y la estructura molecular del polímero.

Capítulo 3

Degradación hidrolítica heterogénea de microesferas de PLGA

3.1 Introducción

Las microesferas de PLGA se han estudiado ampliamente como sistemas de administración de fármacos (Tang y col., 2015; Qi y col., 2013; Freiberg y Zhu, 2004; Varde y Pack, 2004). Entre los polímeros biodegradables, el PLGA es comúnmente empleado debido a su aprobación por la FDA y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para el uso parenteral y a la posibilidad de controlar su velocidad de degradación. Es posible controlar el tiempo de degradación de la matriz polimérica mediante la elección apropiada de sus propiedades físicas, tales como peso molecular del polímero y composición del copolímero para conseguir una dosificación deseada (Li y col., 2012; Zilberman y Grinberg, 2008; Blanco y Alonso, 1998).

La degradación juega un papel importante en el proceso de liberación de fármacos desde microesferas de PLGA. Durante la degradación del polímero se generan oligómeros con grupos terminales ácidos que difunden en el interior de las partículas hacia el medio circundante. Por otro lado, las bases del medio pueden difundir en las micropartículas neutralizando los grupos ácidos generados. Sin embargo, el transporte de masa difusional es relativamente lento, especialmente en matrices basadas en polímeros (Klose y col., 2006). De este modo, la velocidad a la que se generan los productos de degradación ácidos dentro de las micropartículas puede ser mayor que la velocidad a la que se neutralizan, disminuyendo el pH del sistema. Varios estudios han demostrado la presencia de un ambiente ácido en el interior de matrices poliméricas de PLGA utilizando métodos indirectos (Liu y Schwendeman, 2012; Fu y col., 2000; Brunner y col., 1999). La disminución del pH interno promueve una mayor degradación del polímero debido a que la escisión de los enlaces éster es catalizada por los grupos terminales ácidos. Con el aumento del tamaño de las micropartículas, las vías de difusión de las especies aumentan. Así, las velocidades de difusión disminuyen y la caída en el micro-pH y la aceleración de la degradación del polímero se hacen más pronunciadas. Esto es especialmente importante en el centro de las micropartículas debido a que las vías de difusión son las más largas, dando lugar a una degradación de tipo heterogénea (Ford Versypt y col., 2013).

En este capítulo se formula un modelo matemático para describir la degradación hidrolítica heterogénea de microesferas de PLGA. El modelo tiene en cuenta el efecto autocatalítico de los grupos carboxílicos y la composición del copolímero sobre la velocidad de degradación, y se basa en los balances de masa para las diferentes especies

considerando los fenómenos cinéticos y de transporte de masa involucrados. El modelo permite predecir las siguientes evoluciones a lo largo de la degradación: i) perfil radial de pesos moleculares medios y distribución de pesos moleculares; ii) pérdida de masa; iii) concentración de enlaces éster; iv) estructura morfológica de la partícula asociada al efecto autocatalítico. Con el fin de validar el modelo, se prepararon y caracterizaron micropartículas de PLGA de diferentes tamaños y se estudió su degradación en buffer fosfato salino (PBS). Además, el modelo se emplea para estudiar el efecto del tamaño de partícula y del peso molecular inicial del polímero sobre la degradación de las microesferas. Los resultados obtenidos en este capítulo fueron publicados en una revista científica internacional [Busatto y col. (2017), “Heterogeneous hydrolytic degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: Mathematical modeling”, *Journal of Applied Polymer Science* 134, 45464, doi: 10.1002/app.45464].

3.2 Trabajo experimental

3.2.1 Materiales

Poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) 50:50, $\overline{M}_w = 6622$ Da (PLGA, Shanghai Easier Industrial Development Co. Ltd., Shanghai, China), tetrahidrofurano (THF; Merck), diclorometano (DC; Ciccarelli), poli(vinilalcohol) (PVA; 205 kDa; grado de hidrólisis 87,7%; Sigma Aldrich), hidrógenofosfato de sodio (Na_2HPO_4 ; Anedra), dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4 ; Anedra), cloruro de sodio (NaCl ; Ciccarelli) y cloruro de potasio (KCl ; Ciccarelli) fueron empleados sin purificación adicional. El agua utilizada para las soluciones, diluciones y medios de degradación fue de calidad ultra pura.

3.2.2 Preparación de las microesferas

Las microesferas se prepararon mediante la técnica de extracción/evaporación de solvente. Con este fin, se disolvieron 450 mg de PLGA en 3 mL de DC y la solución resultante se goteó lentamente sobre la fase acuosa agitada (solución de PVA al 2% p/v, 17 mL) empleando un homogeneizador Ultra-Turrax T25D (IKA, Alemania). La emulsión aceite/agua se agitó durante 5 minutos a diferentes velocidades de agitación. A continuación, se añadieron 70 mL de una solución de PVA al 0,3% p/v y la dispersión se agitó durante 30 min adicionales. El solvente orgánico remanente en las microesferas se eliminó empleando un evaporador rotatorio bajo vacío (400 mbar) durante 3 hs a temperatura ambiente. Las microesferas sólidas se lavaron tres veces con agua desionizada y se colectaron por centrifugación. Finalmente, las partículas se liofilizaron y se almacenaron para futuros ensayos.

3.2.3 Estudios de degradación

Para cada muestra se colocaron 40 mg de microesferas liofilizadas y 10 mL de buffer PBS (1 mM, pH 7,4) en viales de vidrio. Los viales se agitaron orbitalmente a 50 rpm en una estufa con control de temperatura digital a $37,0 \pm 0,5$ °C. Para la caracterización se removió el medio de degradación y las microesferas se secaron bajo vacío a temperatura ambiente hasta peso constante.

3.2.4 Caracterización

3.2.4.a Tamaño medio de partícula

Las muestras de microesferas se resuspendieron en agua destilada y se observaron en un microscopio óptico (DM 2500M, Leica, Alemania) acoplado con una cámara Leica DM 2500M DFC 290HD. Los diámetros medios de las microesferas y las distribuciones de tamaño de partícula se determinaron analizando las imágenes con un software de procesamiento de imágenes. Se midieron aproximadamente 300 partículas por muestra para determinar el diámetro medio.

3.2.4.b Pérdida de masa

La pérdida de masa de las microesferas se determinó gravimétricamente empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Masa remanente} = \frac{w_t}{w_0} \times 100 \quad (1)$$

donde w_0 es el peso seco inicial de las microesferas y w_t es el peso seco de las microesferas luego de la degradación en el tiempo t .

3.2.4.c Determinación de los pesos moleculares

Los pesos moleculares medios del polímero se determinaron por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) empleando un cromatógrafo líquido Waters-Breeze equipado con una columna Waters Styragel (HR 4E, 7,8 mm x 300 mm), una bomba Waters 1525 y un detector de índice de refracción Waters 2414. La fase móvil utilizada fue THF a un caudal de 1,0 mL min⁻¹. Para la calibración se utilizaron estándares de poliestireno (Shodex SM-105, Showa Denko).

3.2.4.d Morfología mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

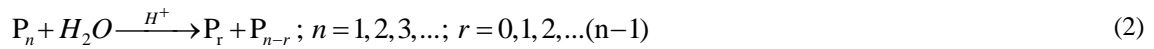
La morfología de las microesferas se estudió mediante SEM. Las muestras se colocaron sobre un taco de aluminio y luego se recubrieron con oro bajo atmósfera de argón (SPI Supplies, 12157-AX) usando condiciones suaves (dos pulverizaciones de 40 s cada una con una intensidad de 15 mA). La morfología de las micropartículas se examinó utilizando un voltaje de aceleración de 20 kV en un equipo JEOL JSM-35C con el programa de adquisición de imágenes JEOL SemAfore.

3.2.4.e Estudio de disolución de oligómeros

El peso molecular de los productos de degradación solubles en agua se determinó mediante SEC empleando un cromatógrafo líquido Waters-Breeze equipado con una columna Waters Ultrahydrogel 120 (7,8 mm x 300 mm), una bomba Waters 1525 y un detector de índice de refracción Waters 2414. La fase móvil empleada fue buffer PBS (0,1 mM, pH 7,4) a un caudal de 0,8 mL min⁻¹. Para la calibración se utilizaron estándares de polietilenglicol (PPS Polymer Standards Service GmbH).

3.3 Modelo matemático

El modelo matemático de degradación hidrolítica heterogénea de microesferas de PLGA se basa en un mecanismo cinético detallado que incluye la hidrólisis de los diferentes tipos de enlaces éster en el copolímero por escisión de cadena aleatoria y considera el efecto autocatalítico de los grupos carboxílicos y la composición del polímero sobre la velocidad de degradación. La ecuación general para la reacción de hidrólisis catalizada por ácido puede expresarse como sigue:

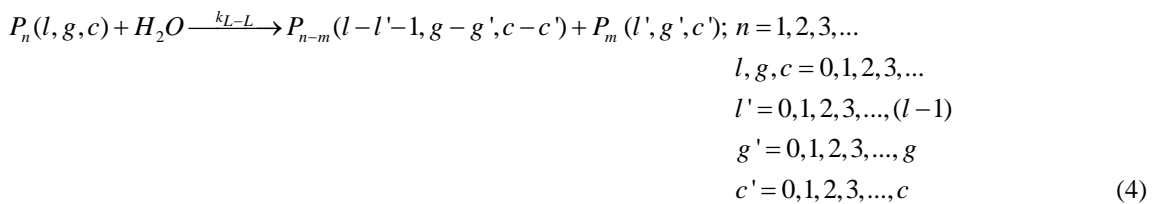


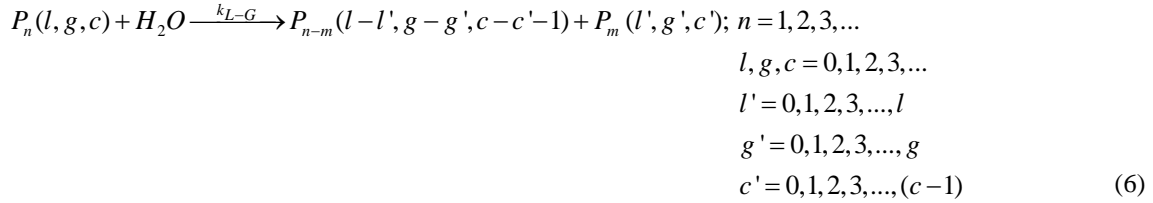
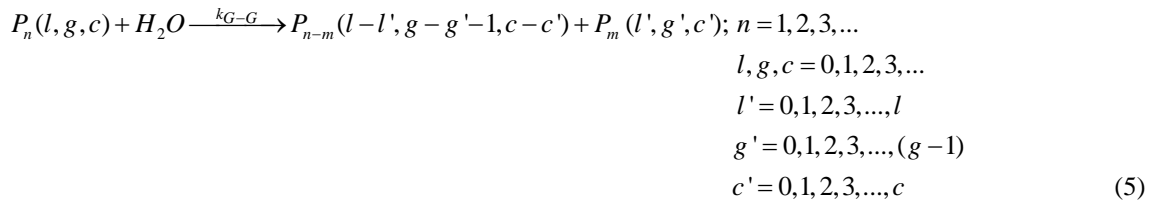
donde P_n y P_r son cadenas de polímero de longitud n y r respectivamente, y H^+ es el catalizador ácido.

La degradación del polímero genera cadenas más cortas que contienen grupos alcoholes y ácidos carboxílicos, designados como COOH y OH, respectivamente. Se puede escribir el siguiente equilibrio de disociación global para los grupos ácidos:



Seguendo el modelo matemático presentado en el Capítulo 2, la Ec. 2 se puede extender para considerar las diferentes especies y la hidrólisis de los distintos tipos de enlaces éster:





En las Ecs. 4-6, las especies poliméricas se caracterizan por su longitud de cadena y por el número de cada tipo de enlace éster. Se adopta la siguiente nomenclatura: $P_n(l, g, c)$ representa una cadena polimérica de longitud n con l , g , y c , enlaces éster Láctico-Láctico (L-L), Glicólico-Glicólico (G-G) y Láctico-Glicólico (L-G), respectivamente; y k_{L-L} , k_{G-G} , k_{L-G} son las constantes de hidrólisis correspondientes a los enlaces éster de L-L, G-G y L-G, respectivamente.

De la cinética de las Ecs. 2-6, y considerando el transporte radial de masa de las especies, se desarrolló el modelo matemático descrito en el Apéndice B. El modelo asume las siguientes hipótesis: (i) las constantes de velocidad de hidrólisis son independientes de la longitud de cadena; (ii) los enlaces éster están distribuidos uniformemente dentro de la cadena polimérica; (iii) todas las partículas tienen el mismo tamaño (igual a su diámetro medio) y son modeladas como una esfera de volumen constante; (iv) el polímero es totalmente amorfo; (v) se pueden disolver especies de oligómeros con una longitud de cadena hasta n_s , siendo n_s la longitud de cadena crítica para la disolución de oligómeros (Park, 1994); (vi) el volumen de medio de degradación excede en gran medida el volumen de las micropartículas; (vii) la velocidad de generación de catalizador ácido (H^+) en el interior de las micropartículas es mayor que la velocidad de difusión. Además, para cuantificar el transporte de masa, se considera la variación del coeficiente de difusión con el peso molecular promedio en peso del polímero.

El modelo matemático se implementó en una rutina Matlab. El mismo consiste en un conjunto de ecuaciones diferenciales parciales resueltas usando un esquema de diferencias finitas para discretizar la dimensión radial y el método de Euler hacia adelante para la discretización temporal. El tiempo de cálculo típico en un procesador Intel® Core 2 Duo osciló entre 1-3 minutos por simulación. El modelo fue ajustado y

validado con los datos experimentales. A este efecto, las constantes cinéticas k_{L-L} , k_{G-G} y k_{aI} , y el parámetro de transporte k_D se ajustaron simultáneamente para simular las evoluciones de \overline{M}_n , \overline{M}_w y pérdida de masa. Otros parámetros (K_a y D_{olig}^o) se tomaron de la literatura.

3.4 Resultados y discusión

Para estudiar el efecto del tamaño de partícula sobre la velocidad de degradación de la matriz polimérica se prepararon microesferas de PLGA con dos tamaños bien diferenciados. Los diámetros medios de partícula fueron de $8,9 \pm 3,3$ y $52,4 \pm 17,7$ μm , y se obtuvieron empleando velocidades de homogeneización de 4000 y 500 rpm durante su preparación, respectivamente. En la Fig. 3.1 se presentan las micrografías obtenidas por SEM de las micropartículas. Ambas formulaciones resultaron esféricas y con superficie lisa. Las microesferas más grandes presentaron una mayor polidispersidad en el tamaño de partícula en comparación con las de menor tamaño.

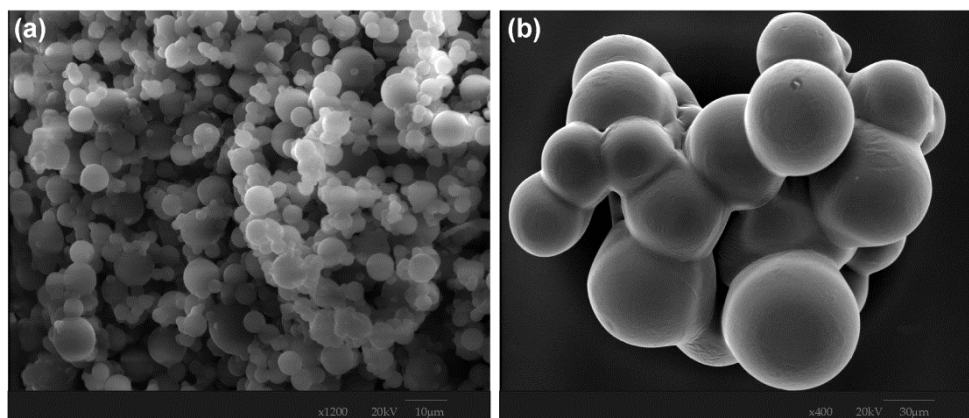


Figura 3.1: Micrografías de SEM de las microesferas de PLGA: a) Diámetro medio de $8,94 \pm 3,30$ μm ; b) Diámetro medio de $52,37 \pm 17,73$ μm .

Los datos experimentales de los estudios de degradación se presentan en las Figs. 3.2 y 3.3. La Fig. 3.2 muestra las evoluciones de pesos moleculares medios para ambos tamaños de microesferas. Se pueden identificar tres etapas en el perfil de degradación. Inicialmente, la degradación se produce lentamente debido a la baja concentración de grupos ácidos carboxílicos terminales. A medida que avanza la degradación, el número de grupos de ácido carboxílico aumenta y acelera la reacción de hidrólisis. Finalmente, la baja concentración de enlaces éster retrasa la degradación. Además se puede observar que la degradación de las microesferas aumenta con el tamaño de partícula. La influencia del tamaño de partícula sobre la velocidad de degradación se atribuye al hecho de que los productos de degradación formados en el interior de las partículas más pequeñas pueden difundir fácilmente a la superficie y disolverse en el medio, mientras que en las partículas de mayor tamaño la longitud de difusión es mayor. Por lo tanto, los

productos de degradación que poseen grupos terminales ácidos se acumulan en el interior de las partículas de mayor tamaño y tienen el potencial de catalizar la degradación del material polimérico remanente.

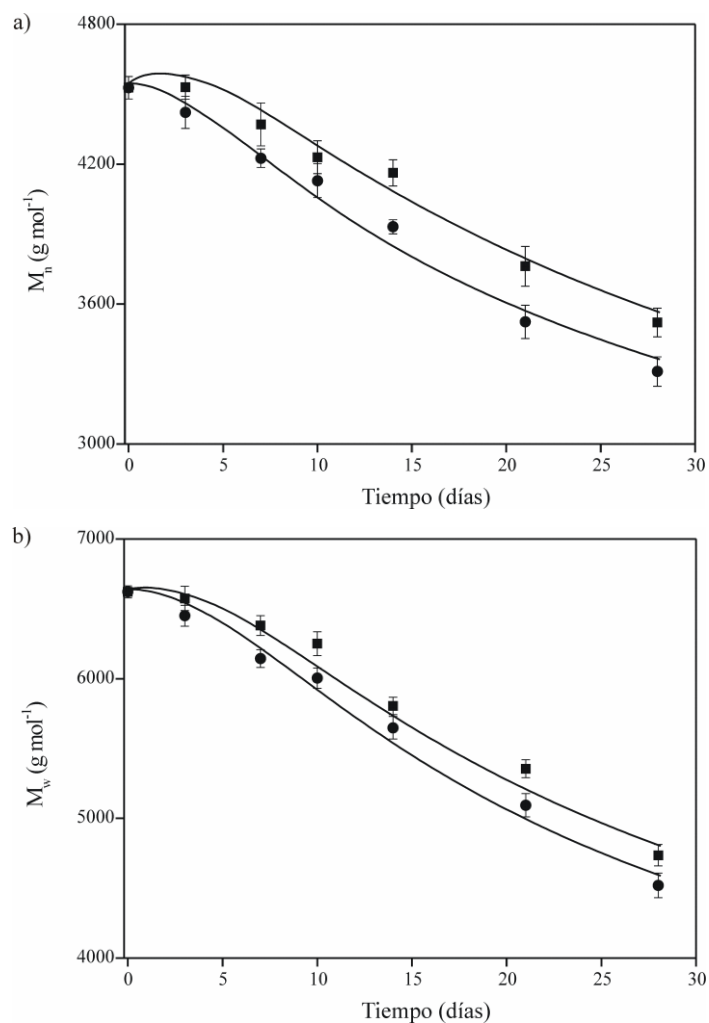


Figura 3.2: Evolución de los pesos moleculares medios de las micropartículas de PLGA de diferentes diámetros: a) \overline{M}_n ; b) \overline{M}_w ; (■) $8,94 \pm 3,30 \mu\text{m}$, (●) $52,37 \pm 17,73 \mu\text{m}$, (—) Predicción del modelo.

La Fig. 3.3a muestra la evolución de la masa remanente de microesferas durante los ensayos de degradación. Se observó una pérdida de masa despreciable ($< 5\%$) para ambos tamaños de microesferas durante los primeros 5 días, seguido por un incremento progresivo de la pérdida de masa durante el tiempo de degradación. Esto puede explicarse por el hecho de que el polímero debe sufrir una degradación suficientemente extensa para producir monómeros y oligómeros solubles en agua, razón por la cual no

se observa una reducción significativa de la masa al comienzo del experimento. Este comportamiento está en acuerdo con datos reportados (Fitzgerald y Corrigan, 1996, Wang y col., 1990). La pérdida de masa es similar para ambas micropartículas en tiempos cortos de degradación. Al aumentar el tamaño de partícula, los oligómeros experimentan trayectos difusivos más largos. Sin embargo, la autocatálisis acelera la cinética de degradación y por lo tanto, la porosidad de las partículas y la velocidad de pérdida de masa es mayor en las partículas de mayor tamaño con el transcurso del proceso de degradación.

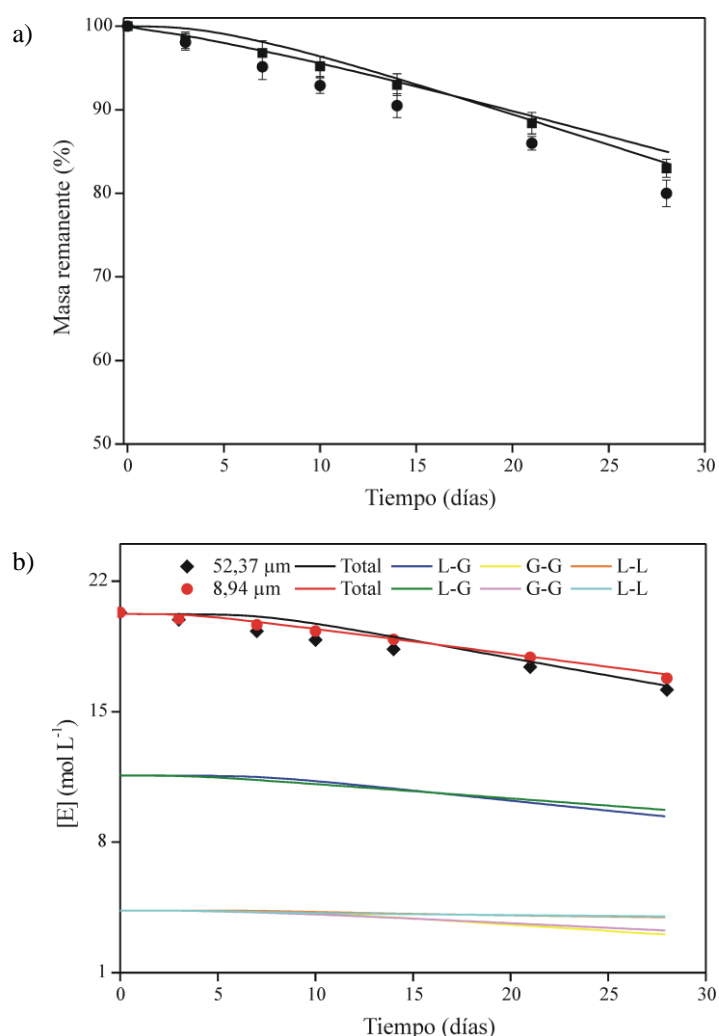


Figura 3.3: a) Evolución de la pérdida de masa de las micropartículas de PLGA con diferentes diámetros: (■) $8,94 \pm 3,30 \mu\text{m}$, (●) $52,37 \pm 17,73 \mu\text{m}$, (-) Predicción del modelo; b) Evolución de las concentraciones de enlaces éster en las micropartículas de PLGA con diferentes tamaños de partícula (datos experimentales en símbolos y resultados de simulación en líneas continuas).

La evolución de las concentraciones de enlaces éster en la partícula se calculó a partir de los valores de pesos moleculares medios y de la composición del copolímero considerando una distribución de enlaces aleatoria. Estos resultados se muestran en la Fig. 3.3b. Los perfiles de concentración de enlaces éster son similares para ambos tamaños de partículas en tiempos cortos de degradación. Sin embargo, la disminución de la concentración de enlaces éster es mayor en las partículas de mayor tamaño con el transcurso de la degradación a causa del efecto de autocatálisis.

En las Figs. 3.2 y 3.3 se presentan además las predicciones teóricas del modelo. Como se puede observar, el modelo es capaz de predecir con precisión la disminución de pesos moleculares medios durante la degradación y por tanto, la distribución completa de pesos moleculares. Las constantes cinéticas y los parámetros de transporte se ajustaron simultáneamente y se encuentran listados en la Tabla 3.1. La constante de hidrólisis k_{L-G} se estimó considerando que es un valor medio entre las constantes k_{L-L} y k_{G-G} . Las constantes de disociación ácida directa e inversa, k_{a1} y k_{a2} , se encuentran relacionadas por la constante de disociación de equilibrio de los grupos carboxílicos (K_a). Los resultados indican que la velocidad de escisión de los enlaces G-G es más rápida que la de los enlaces L-L, en concordancia con observaciones experimentales de la literatura (Hakkarainen y col., 1996; Vey y col., 2008). El valor medio estimado de longitud de cadena a partir del cual los oligómeros pueden disolverse en el medio (n_s) resultó ser de 16 unidades repetidas, de acuerdo con las determinaciones experimentales realizadas por SEC y con datos reportados en condiciones experimentales similares (Park, 1994).

Los perfiles de pérdida de masa estimados y experimentales presentan algunas diferencias. Es posible que se hayan introducido algunos errores sistemáticos debido al método de determinación. Durante la remoción de la solución *buffer* luego del periodo de degradación, una pequeña cantidad de polímero no disuelto puede haber sido removido por la jeringa. Esto ocasionaría un aumento en la pérdida de masa durante el experimento. Sin embargo, el modelo permite calcular razonablemente la pérdida de masa y predecir adecuadamente la tendencia experimental. Por lo tanto, se puede concluir que el modelo es capaz de describir la disminución de pesos moleculares medios de una manera precisa y también es capaz de predecir razonablemente la tendencia de pérdida de masa del polímero.

Tabla 3.1. Constantes cinéticas y parámetros de transporte

k_{L-L} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	$2,55 \times 10^{-7}$	Ajustada
k_{G-G} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	$1,27 \times 10^{-6}$	Ajustada
k_{L-G} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	$7,63 \times 10^{-7}$	Antheunis y col., 2009
k_{a1} (s ⁻¹)	$5,0 \times 10^{-8}$	Ajustada
k_{a2} (s ⁻¹) = k_{a1}/K_a ($K_a = 3,38 \times 10^{-4}$)	$1,48 \times 10^{-4}$	Hagberg y col., 2002
D_{olig}^o (cm ² s ⁻¹)	$1,0 \times 10^{-14}$	Ford y col., 2011; Wang y col., 2008
k_D	$4,0 \times 10^1$ ^(a) $7,0 \times 10^2$ ^(b)	Ajustada

^(a) Diámetro promedio: $8,94 \pm 3,30 \mu\text{m}$; ^(b) Diámetro promedio $52,37 \pm 17,73 \mu\text{m}$.

El modelo se utilizó además para simular las evoluciones de las distribuciones de pesos moleculares (DPM) y la estructura morfológica de las partículas durante la degradación (Figs. 3.4 y 3.5), y para estudiar el efecto de los parámetros experimentales sobre la cinética de degradación (Figs. 3.6 y 3.7). Las evoluciones teóricas de las DPM se muestran en la Fig. 3.4. Como es de esperar, las DPM se desplazan hacia pesos moleculares inferiores a medida que avanza el tiempo de degradación. Este desplazamiento se incrementa con el tamaño de partícula debido al efecto autocatalítico.

En la Fig. 3.5 se muestran las evoluciones simuladas de los perfiles radiales de \overline{M}_w en el interior de las micropartículas durante la degradación. Los resultados indican una degradación no uniforme, que se acentúa con el incremento del tamaño de partícula. La acumulación de los productos de degradación con grupos carboxílicos terminales dentro de la matriz polimérica genera la autocatálisis, provocando que la degradación proceda más rápidamente en el centro que en la superficie de las partículas. Como puede observarse, este efecto se hace más importante a medida que se incrementa el tamaño de partícula debido a que la trayectoria de difusión es más larga.

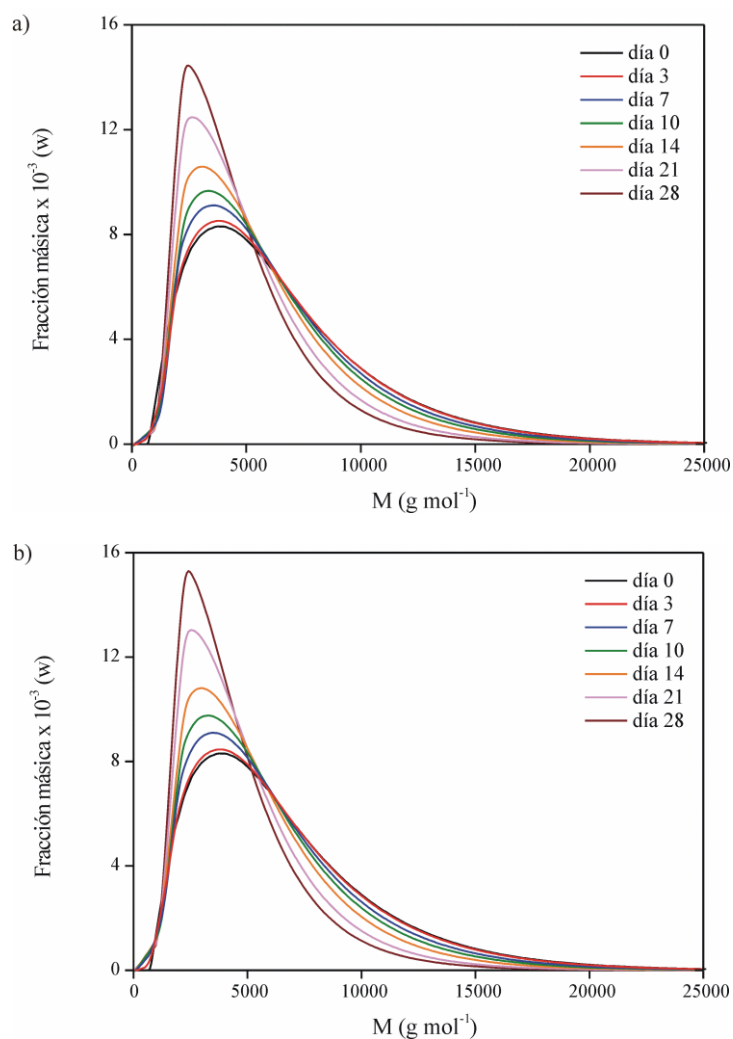


Figura 3.4: Distribuciones de pesos moleculares simuladas: a) Micropartículas de $8,94 \pm 3,30 \mu\text{m}$; b) Micropartículas de $52,37 \pm 17,73 \mu\text{m}$.

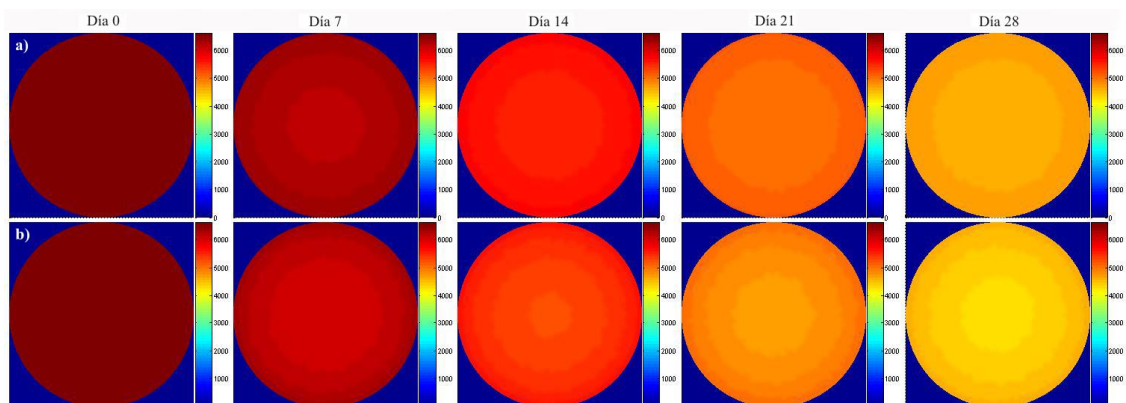


Figura 3.5: Perfiles radiales de \overline{M}_w simulados en el interior de las micropartículas durante la degradación: a) Micropartículas de $8,94 \pm 3,30 \mu\text{m}$; b) Micropartículas de $52,37 \pm 17,73 \mu\text{m}$.

La Fig. 3.6 presenta las evoluciones simuladas de \overline{M}_w y pérdida de masa para micropartículas de diferentes tamaños. La degradación del polímero es más pronunciada con el aumento de la dimensión de las micropartículas. La longitud de las vías de difusión para los productos de degradación ácidos aumenta con el tamaño de las micropartículas, lo que conduce a una disminución más rápida del pH interno y, por lo tanto, se acelera la escisión de los enlaces éster. La pérdida de masa es mayor para las micropartículas más pequeñas en tiempos cortos de degradación porque poseen una mayor área superficial y caminos difusivos más cortos. Sin embargo, la pérdida de masa para las partículas más grandes es mayor a medida que la degradación procede debido a que los efectos autocatalíticos se hacen más importantes. Las tendencias teóricas están de acuerdo con los datos experimentales reportados (Siepmann y col., 2005; Dunne y col., 2000).

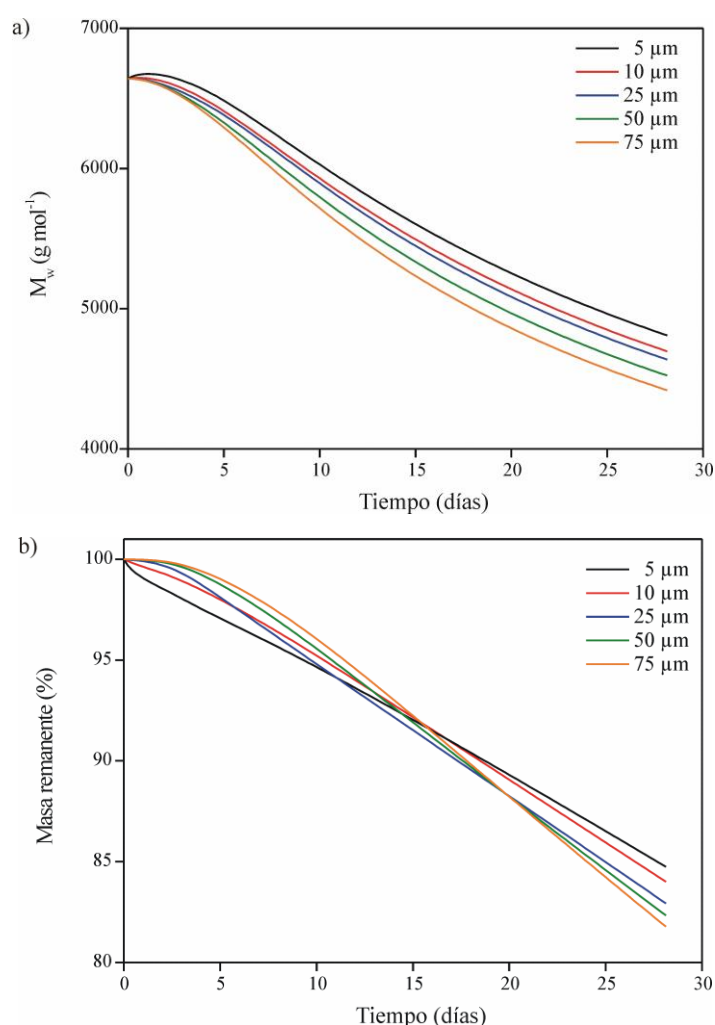


Figura 3.6: Efecto del diámetro medio de partícula sobre la velocidad de degradación. a) Evolución estimada de \overline{M}_w ; b) Evolución estimada de la pérdida de masa.

La Fig. 3.7 muestra las evoluciones predichas de \overline{M}_w y pérdida de masa para las micropartículas de 50 μm en función del peso molecular inicial del PLGA. En concordancia con datos publicados (Raman y col., 2005), se puede observar que el peso molecular disminuye más rápidamente al incrementar el peso molecular inicial del PLGA. Esto se atribuye al hecho de que los productos de degradación ácidos permanecen mayor tiempo en el interior de las partículas ya que deben experimentar un mayor grado de degradación para alcanzar el valor crítico de disolución en el medio, lo cual promueve la autocatálisis. Sin embargo, la pérdida de masa es mayor para pesos moleculares iniciales menores debido a la rápida generación de monómeros y oligómeros que pueden difundir en las microesferas y disolverse en el medio.

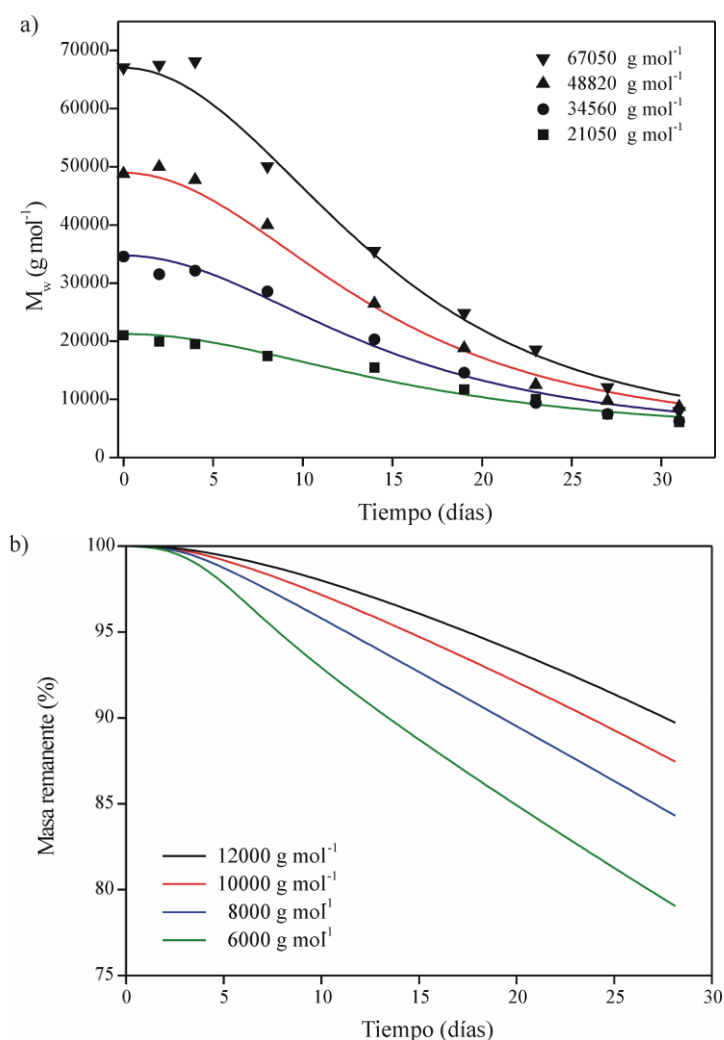


Figura 3.7: Efecto del peso molecular inicial del PLGA sobre la degradación de micropartículas de 50 μm . a) Evolución estimada de \overline{M}_w (datos experimentales en símbolos y resultados de simulación en líneas continuas). Los datos experimentales fueron tomados de Raman y col. (2005); b) Evolución estimada de la pérdida de masa.

3.5 Conclusiones

Se desarrolló un modelo matemático para predecir la degradación hidrolítica heterogénea de microesferas de PLGA. El modelo permite estimar las evoluciones de pesos moleculares medios, distribuciones de pesos moleculares, concentraciones de enlaces éster y pérdida de masa de las micropartículas durante la degradación. El modelo fue ajustado y validado con datos experimentales de degradación de microesferas de PLGA con diferentes diámetros medios preparadas por el método de extracción/evaporación de solvente. Los resultados teóricos presentan buena concordancia con las mediciones experimentales. Además, el modelo fue capaz de predecir los cambios morfológicos de las micropartículas asociados al efecto autocatalítico de degradación y se empleó para estudiar el efecto del tamaño de partícula y el peso molecular inicial del PLGA sobre la velocidad de degradación de las micropartículas. El modelo puede emplearse para diseñar un sistema de liberación controlada de fármacos basado en micropartículas con un tiempo de degradación preespecificado. En el capítulo siguiente, el modelo matemático se extenderá para predecir la liberación controlada de progesterona a partir de las micropartículas de PLGA.

Capítulo 4

Microesferas de PLGA para la liberación controlada de progesterona

4.1 Introducción

El PLGA se ha estudiado extensamente como biomaterial para el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos (Han y col., 2016; Guo y col., 2015). En comparación a las terapias farmacológicas convencionales, la liberación controlada de fármacos permite mantener la concentración del mismo dentro de los rangos terapéuticos por períodos prolongados, disminuir los efectos secundarios causados por los excesos de concentración y las administraciones repetidas, mejorar la conformidad del paciente, entre otras ventajas (Hines y Kaplan, 2013). Las microesferas de PLGA se han empleado ampliamente para este propósito debido a su biodegradabilidad en medios acuosos, tales como los tejidos vivos, y a que sus productos de degradación son inocuos (Garner y col., 2015).

Varios procesos contribuyen a la cinética de liberación del fármaco desde las microesferas de PLGA, incluyendo el transporte difusivo del fármaco a través de la matriz polimérica, la degradación del polímero por hidrólisis autocatalítica de los enlaces éster, la erosión de la matriz polimérica y la evolución de su estructura porosa (Fredenberg y col., 2011). Comprender la relación entre estos fenómenos es importante para poder determinar la contribución o preponderancia de cada uno de ellos a la cinética de liberación del fármaco bajo diferentes condiciones. Existen otros factores que contribuyen a la cinética de liberación del fármaco a partir de micropartículas de PLGA, tales como el tamaño de partícula (Chen y col., 2017, Fu y col., 2005), la porosidad inicial de las partículas (Wang y col., 2015, Klose y col., 2006) y la distribución del fármaco en el interior de la matriz polimérica (Cai y col., 2009).

Los perfiles de liberación de fármacos pueden ser bifásicos o trifásicos, dependiendo de la dinámica de los procesos involucrados: efecto “burst”, difusión a través de la matriz polimérica y los poros acuosos, y la degradación y erosión del polímero (Regnier-Delplace, 2013; Berchane y col., 2007). La difusión a través de la matriz polimérica densa se limita a moléculas hidrofóbicas pequeñas, ya que la matriz de PLGA es hidrofóbica (Fredenberg y col., 2011). Para los fármacos altamente solubles en agua y de dimensiones macromoleculares, tales como proteínas y péptidos, la difusión a través de los poros acuosos es el principal mecanismo de transporte. El transporte del fármaco a menudo se caracteriza por el denominado efecto "burst" durante la etapa inicial del proceso de liberación, en la cual se libera rápidamente una fracción significativa del fármaco. Este efecto se relaciona con el fármaco encapsulado

en la región cercana a la superficie de las microesferas y se ha reportado para diversas formulaciones de microesferas de PLGA (Allison, 2008). La liberación posterior del fármaco es controlada por la difusión a través de la matriz polimérica y de los poros acuosos, de acuerdo a las propiedades de transporte del fármaco. Además puede existir una fase adicional de liberación dependiendo de la dinámica de degradación del polímero, en la cual se observa una rápida liberación del fármaco debido a la presencia de grandes poros generados como consecuencia de la extensa degradación del polímero, pero también puede atribuirse a la presencia de grietas o a la desintegración de las partículas (Thakur y Thakur, 2015). Las microesferas de menores dimensiones presentan cinéticas de liberación más rápidas debido a que las vías de difusión son más cortas y los gradientes de concentración son mayores. Por otro lado, la difusión de los productos de degradación ácidos puede ocurrir rápidamente en microesferas pequeñas o porosas que suprimen las heterogeneidades en el pH interno y la erosión debida a la autocatálisis, por lo cual su velocidad de degradación es menor.

En la formulación del fármaco, el control sobre la cinética de liberación es clave para lograr un efecto farmacocinético óptimo. La polidispersidad en tamaño y morfología de las partículas obtenidas a partir de los métodos de preparación convencionales (homogeneización, agitación mecánica y sonicación) pueden producir variaciones indeseables en la velocidad de degradación de las partículas, la estabilidad del medicamento y la cinética de liberación del mismo (Sansdrap y Moes, 1993). Como alternativa, la microfluídica permite la obtención de partículas altamente monodispersas con morfología controlada (Duncanson y col., 2012). Esto ofrece un control significativamente mayor sobre la cinética de liberación del fármaco, minimizando el fenómeno de liberación inicial rápida (efecto “burst”) que se observa comúnmente con partículas polidispersas (Xu y col., 2009).

Los modelos matemáticos son una herramienta importante en las ciencias biomédicas ya que pueden emplearse para diseñar u optimizar nuevos sistemas de administración de fármacos de acuerdo con los requerimientos de composición, geometría, dimensión y perfiles de liberación. Por lo tanto, es posible reducir significativamente el número de estudios experimentales necesarios durante el desarrollo de un dispositivo, ahorrando tiempo y reduciendo los costos. En este sentido, se han desarrollado diferentes modelos matemáticos para predecir la liberación controlada de fármacos a partir de micropartículas de PLGA. Un enfoque común ha sido correlacionar la difusividad efectiva del fármaco con la evolución del peso molecular promedio en peso de la matriz

polimérica basado en un ajuste empírico de los datos experimentales (Faisant y col., 2002; Raman y col., 2005; Berchane y col., 2007). Siepmann y col. (2005) propusieron un método empírico para el transporte de fármacos en el cual microesferas de distintos tamaños presentan diferentes difusividades efectivas constantes, utilizando la solución analítica a la ecuación de difusión. Los autores concluyeron que la fuerte dependencia de la movilidad del fármaco en función del tamaño de las microesferas resalta la importancia de la autocatálisis. Siepmann y col. (2002) desarrollaron un modelo para la liberación de fármacos a partir de micropartículas de PLGA considerando la disolución del fármaco, la porosidad del sistema y la geometría tridimensional de los dispositivos. La difusividad efectiva del fármaco fue expresada como un producto de un coeficiente de difusión crítico y de la porosidad del sistema, esta última estimada mediante simulaciones de Monte Carlo. Ford y col. (2011) propusieron un modelo matemático de reacción-difusión para la liberación de fármacos a partir de microesferas de PLGA, considerando la degradación autocatalítica de la matriz polimérica y la evolución de la estructura porosa. Los perfiles de liberación estimados considerando difusividad efectiva variable mostraron dependencia con el tamaño de partícula. Casalini y col. (2014) presentaron un modelo matemático capaz de predecir la degradación y liberación de fármacos desde micropartículas de PLGA. El modelo consiste en un sistema de ecuaciones diferenciales parciales, resuelto por medio del método de las líneas. El modelado de la degradación del polímero tiene en cuenta el efecto autocatalítico debido al entorno ácido en el interior de las partículas y el modelado de la liberación considera tanto la disolución del fármaco como la difusión del fármaco disuelto a través de la matriz polimérica. Se utilizó un coeficiente de difusión efectivo que tiene en cuenta el aumento de la difusividad de la droga debido a la hidrólisis del polímero.

En este capítulo se investiga la preparación de microesferas de PLGA con el fin de estudiar la encapsulación y liberación controlada de progesterona. Las microesferas se prepararon por las técnicas de extracción/evaporación de solvente y microfluídica. Las partículas fueron caracterizadas por su distribución de tamaños, eficiencia de encapsulación, morfología y propiedades térmicas. Se estudió el efecto del tamaño de partícula, la polidispersidad y la degradación de la matriz polimérica sobre la liberación *in vitro* de la hormona. Además, se extendió el modelo de degradación hidrolítica heterogénea de micropartículas de PLGA con el fin de predecir los perfiles de liberación

de progesterona. El modelo tiene en cuenta la disolución y el transporte de droga intrapartícula, así como también el efecto autocatalítico de degradación del polímero. Los resultados obtenidos en este capítulo fueron publicados en una revista científica internacional: [Busatto y col. (2018), “Effect of particle size, polydispersity and polymer degradation on progesterone release from PLGA microparticles: experimental and mathematical modeling”, *International Journal of Pharmaceutics* 536, 360-369].

4.2 Trabajo experimental

4.2.1 Materiales

PLGA 50:50, $\overline{M}_w = 6622 \text{ g mol}^{-1}$ (PLGA, Shanghai Easier Industrial Development Co. Ltd., Shanghai, China), progesterona (99,2%, Farmabase), tetrahidrofurano (THF; Merck), diclorometano (DC; Ciccarelli), poli(vinilalcohol) (PVA; 205 kDa; grado de hidrólisis 88,3%; Serquim), polisorbato 80 (Tween 80; Anedra), hidrógenofosfato de sodio (Na_2HPO_4 ; Anedra), dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4 ; Anedra), cloruro de sodio (NaCl ; Ciccarelli) y cloruro de potasio (KCl ; Ciccarelli). Todos los reactivos se utilizaron sin purificación adicional. El agua utilizada para las soluciones, diluciones y medios de liberación fue de calidad ultra pura.

4.2.2 Metodología

4.2.2.1 Preparación de las microesferas por el método de extracción/evaporación de solvente

Las microesferas se prepararon utilizando la técnica de extracción/evaporación de solvente. Brevemente, se disolvieron 450 mg de PLGA y la hormona (20, 30 y 40% p/p) en 3 mL de cloruro de metileno y la solución se goteó lentamente sobre la fase acuosa agitada (17 mL de solución de PVA al 2% p/v) mediante un homogeneizador (Ultra-Turrax T25D, IKA). La emulsión se agitó durante 5 min, luego se añadieron 70 mL de una solución de PVA al 0,3% y la mezcla resultante se agitó durante 15 o 30 min adicionales. El solvente remanente en las microesferas se evaporó por medio de un rotavapor, operando bajo vacío durante 3 h a temperatura ambiente. Las partículas sólidas se lavaron tres veces con agua desionizada y se recolectaron por centrifugación o por decantación según el tamaño de partícula. Finalmente, las microesferas se liofilizaron y se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis. Se prepararon tres lotes de microesferas (Experimentos A, B y C) utilizando diferentes condiciones (ver Tabla 4.1) para obtener microesferas con diferentes tamaños medios de partícula.

4.2.2.2 Preparación de las microesferas por microfluídica

Para la preparación de las micropartículas se utilizó un dispositivo de microfluídica con geometría “co-flow”. Como se muestra en la Fig. 4.1, el sistema se encuentra constituido por dos tubos capilares concéntricos de sílice fundida (llamados tubo 1 y

tubo 2) y una unión en T. El tubo 1 (diámetro interior: 75 μm ; diámetro exterior: 148 μm) asociado con un acoplador capilar (1/16'', diámetro interior de 180 μm) se insertó dentro de la unión en T (1/16'') a lo largo de su eje principal. Este tubo atraviesa la unión en T y finaliza en el interior del tubo 2 (diámetro interior: 250 μm ; diámetro exterior: 356 μm). La unión en T permite la inyección de la fase dispersa en el seno de la fase continua.

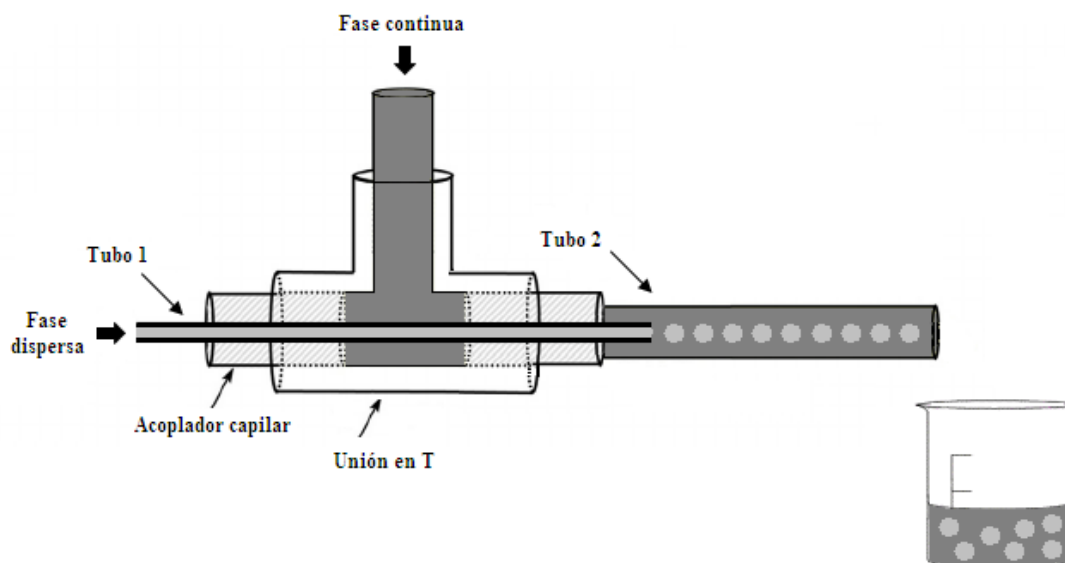


Figura 4.1: Dispositivo de microfluídica empleado para la preparación de las micropartículas.

Como fase continua se empleó una solución de PVA al 1% p/v. La fase dispersa se preparó disolviendo 100 mg de PLGA y la hormona (20% p/p) en 2,5 mL de cloruro de metileno. Las fases dispersa y continua se inyectaron en el dispositivo utilizando bombas de jeringa y las velocidades de flujo fueron de 450 $\mu\text{L min}^{-1}$ y 1020 $\mu\text{L min}^{-1}$, respectivamente. La emulsión resultante se colectó durante 30 minutos en un vaso de precipitados conteniendo 100 mL de agua ultrapura. Las partículas colectadas fueron inmediatamente colocadas en agitación, empleando un agitador mecánico a 200 rpm durante 1 hora para extraer el solvente remanente en las partículas. Luego, las partículas se separaron por decantación y fueron lavadas dos veces con agua ultrapura. Finalmente, las partículas fueron liofilizadas y almacenadas para ensayos posteriores.

4.2.2.3 Caracterización de las micropartículas

4.2.2.3a Tamaño medio y distribución de tamaños de partícula

Las muestras de microesferas se resuspendieron en agua destilada y se observaron en un microscopio óptico (DM 2500M, Leica) acoplado con una cámara para la toma de imágenes (DM 2500M DFC 290HD, Leica). Los diámetros medios de las microesferas y las distribuciones de tamaño de partícula se determinaron analizando las imágenes con un software de procesamiento de imágenes. Se midieron aproximadamente 300 partículas por muestra para determinar el diámetro medio.

4.2.2.3b Caracterización térmica

Las propiedades térmicas de la progesterona, del PLGA y de las micropartículas cargadas con progesterona se investigaron empleando un calorímetro diferencial de barrido (DSC Q2000, TA Instrument). Las muestras (3-5 mg) se colocaron en recipientes de aluminio, se cerraron herméticamente y se calentaron a una velocidad de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ bajo una atmósfera inerte de nitrógeno con un caudal de 50 mL min^{-1} . El flujo de calor se registró en un intervalo de temperatura de 0 a $160\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las muestras se enfriaron utilizando un sistema de refrigeración (RSC90, instrumentos TA) y se calentaron de nuevo bajo las mismas condiciones.

4.2.2.3c Carga inicial de la droga

Para determinar la carga inicial de fármaco se colocaron 10 mg de micropartículas en 50 mL de etanol y se incubaron durante 24 h bajo agitación suave. La cuantificación de la droga se realizó por HPLC empleando un cromatógrafo Shimadzu modelo Prominence LC20A, equipado con una columna ZORBAX® Eclipse XDB-C₁₈ (tamaño de partícula de $5\text{ }\mu\text{m}$, $250 \times 4,6\text{ mm}$) y detector de arreglo de diodos. La fase móvil consistió en una mezcla de metanol/agua (95:5 v/v) empleando un caudal de $1,0\text{ mL min}^{-1}$. La temperatura de la columna y la longitud de onda de detección fueron $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 254 nm , respectivamente.

4.2.2.3d Ensayos de liberación *in vitro*

Las micropartículas cargadas con progesterona (20 mg aproximadamente) se incubaron en 200 mL de buffer fosfato pH 7,4 conteniendo 1% p/v de Tween 80 en

frascos de vidrio. Los recipientes se mantuvieron a 37 °C bajo agitación orbital a 50 rpm. A intervalos de tiempo predeterminados, se retiraron muestras de 4 mL y se reemplazaron con un volumen igual de medio fresco. Las muestras se analizaron por HPLC empleando la metodología descrita en la sección 4.2.2.3c.

4.2.2.4 Modelo matemático de liberación controlada

Se desarrolló un modelo matemático para predecir la liberación controlada de progesterona a partir de las microesferas de PLGA. El modelo tiene en cuenta la disolución y la difusión del fármaco, así como también el efecto de la degradación del polímero sobre la velocidad de liberación a partir de microesferas con diferentes tamaños medios. El modelo consta de los siguientes módulos:

4.2.2.4a Módulo de degradación

Se basa en el modelo de degradación hidrolítica heterogénea de micropartículas de PLGA presentado en el Capítulo 3. Este módulo asume las siguientes hipótesis: (i) las constantes cinéticas de hidrólisis son independientes de la longitud de cadena; (ii) los diferentes tipos de enlaces éster están distribuidos uniformemente dentro de la cadena polimérica; (iii) todas las partículas tienen el mismo tamaño (igual a su diámetro medio) y se modelan como una esfera de volumen constante; (iv) la matriz polimérica es completamente amorfa; (v) las especies de oligómeros con una longitud de cadena igual o menor a la longitud de cadena crítica pueden disolverse en el medio; (vi) el volumen de medio de degradación excede en gran medida el volumen de micropartículas; (vii) la velocidad de generación del catalizador ácido (H^+) en el interior de las micropartículas es mayor que la velocidad de difusión. Este módulo permite estimar las evoluciones de los pesos moleculares medios y la pérdida de masa de las micropartículas durante la degradación.

4.2.2.4b Módulo de liberación

Este módulo describe el transporte del fármaco intrapartícula. Supone las siguientes hipótesis: i) la estabilidad de la progesterona no se ve afectada por el pH interno de la matriz polimérica; ii) la carga inicial de progesterona que excede su solubilidad en la matriz polimérica está presente como una fase amorfa uniformemente distribuida en la matriz polimérica; iii) la carga de progesterona no afecta a la velocidad de degradación de la matriz polimérica; iv) todas las partículas tienen el mismo tamaño (igual a su

diámetro medio) y se modelan como una esfera de volumen constante. El módulo de liberación se basa en el siguiente sistema que permite describir el proceso de liberación considerando que el principal mecanismo de transferencia de masa es la difusión del fármaco en el interior de la matriz polimérica:

$$\frac{\partial C_{PG}}{\partial t} = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 D_{PG} \frac{\partial C_{PG}}{\partial r} \right) + S \quad t < t^* \quad (1)$$

donde C_{PG} es la concentración de progesterona disuelta en la matriz polimérica, D_{PG} es el coeficiente de difusión de la hormona en la matriz polimérica y S es un término fuente representado por:

$$S = \frac{\partial C_{PG_a}}{\partial t} = k'_a \frac{a_m}{V_p} (C_{PG_m} - C_{PG}) = k_a (C_{PG_m} - C_{PG}) \quad (2)$$

donde C_{PG_a} es la concentración de progesterona en la fase amorfa dispersada en la matriz polimérica, C_{PG_m} es la solubilidad máxima de la progesterona en la matriz polimérica, k'_a es el coeficiente de transferencia de materia de la progesterona relacionado con la fase amorfa y la matriz polimérica, a_m es el área de la fase amorfa y V_p es el volumen de partícula.

Notese que a medida que avanza la degradación, los cambios morfológicos pueden modificar el mecanismo de transporte. De este modo, puede existir un tiempo (denominado t^*) en el que la transferencia de masa en la fase polimérica no es el mecanismo de transporte preferencial en el proceso de liberación.

Las condiciones iniciales de C_{PG} y C_{PG_a} están determinadas por la C_{PG_m} y por la carga efectiva de fármaco ($C_{PG_{eff}}$) respectivamente, considerando una dispersión uniforme del fármaco en el interior de la matriz polimérica:

$$\begin{aligned} C_{PG} &= C_{PG_m} \\ C_{PG_a} &= C_{PG_{eff}} - C_{PG_m} \quad t = 0, 0 \leq r \leq R \end{aligned} \quad (3)$$

Con respecto a las condiciones de contorno, se aplica la condición de simetría para la concentración de progesterona en el centro de las micropartículas y se considera la resistencia a la transferencia de materia en la interfase micropartícula-medio acuoso:

$$\left. \frac{\partial C_{PG}}{\partial r} \right|_{r=0} = 0 \quad (4)$$

$$D_{PG}(r=R) \left. \frac{\partial C_{PG}}{\partial r} \right|_{r=R} = k_{PG} (C_{PG_b} - C_{PG}(r=R)) = -k_{PG} C_{PG}(r=R) \quad (5)$$

donde C_{PG_b} es la concentración de progesterona en el medio de liberación y k_{PG} es el coeficiente de transferencia de materia de progesterona relacionado con la superficie de las partículas y el medio de liberación. El valor de C_{PG_b} se considera despreciable ya que el volumen del medio de liberación es suficientemente grande en comparación con el fármaco liberado.

El parámetro de transporte k_{PG} se puede calcular a partir del número de Sherwood (Sh), que es igual a 2 para sistemas esféricos en condiciones estacionarias (Casalini y col., 2014):

$$Sh = 2 = \frac{k_{PG} 2R}{D_{PG_b}} \quad (6)$$

donde D_{PG_b} es el coeficiente de difusión de la progesterona en el medio de liberación y R es el radio de la partícula.

El incremento de la difusividad del fármaco como consecuencia de la degradación de la matriz polimérica está relacionado con la evolución del peso molecular medio en peso del polímero a través de la siguiente expresión (Ford y col., 2011):

$$D_{PG} = D_{PG}^0 \left[1 + \left(1 - \frac{\overline{M}_w(t)}{\overline{M}_w(t=0)} \right) (k_D - 1) \right] \quad (7)$$

donde D_{PG}^0 es la difusividad inicial de la progesterona, \overline{M}_w es el peso molecular medio en peso del polímero (obtenido por el módulo de degradación) y k_D es un parámetro de ajuste relacionado con las difusividades efectivas de la especies poliméricas en solución acuosa y en el sólido.

Después del tiempo crítico t^* , el sistema se describe a través de un balance de materia macroscópico en la partícula que considera el transporte de masa en la fase fluida, como se indica a continuación:

$$\frac{d \langle C_{PG} \rangle}{dt} = -k_d' \frac{a_p}{V_p} (\langle C_{PG} \rangle - C_{PG_b}) = -k_d (\langle C_{PG} \rangle - C_{PG_b}) = -k_d \langle C_{PG} \rangle \quad t > t^* \quad (8)$$

donde $\langle C_{PG} \rangle$ es la concentración de progesterona promediada en el volumen de las partículas, k_d' es el coeficiente de transferencia de materia de la progesterona relacionado con la superficie de la partícula y el medio de liberación, a_p es el área de la partícula y V_p es el volumen de la partícula.

4.2.2.4c Implementación del modelo

El modelo matemático fue implementado en Matlab. El módulo de degradación se basa en las Ecs. B.1-13 del Apéndice B. El mismo consiste en un conjunto de ecuaciones diferenciales parciales resueltas usando un esquema de diferencias finitas para discretizar la dimensión radial y un método de Euler hacia adelante para la discretización temporal. El tiempo de computación típico en un procesador Intel Core 2 Duo osciló entre 1-3 minutos por simulación. Notese que el módulo de degradación se puede resolver independientemente del módulo de liberación.

El módulo de liberación consta de las Eqs. 1-8 y se resolvió utilizando un esquema de diferencias finitas de segundo orden para discretizar la dimensión radial y un método de Crank-Nicolson para la discretización temporal. El tiempo de computación típico en un procesador Intel® Core 2 Duo osciló entre 1-2 min por simulación. Este módulo requiere los datos de salida del módulo de degradación y están acoplados a través de la Ec. 7.

4.3 Resultados y discusión

En la Fig. 4.2 se muestran las imágenes ópticas de las microesferas de PLGA obtenidas por el método de extracción/evaporación de solvente y por microfluídica. Como se puede observar, las micropartículas resultaron esféricas y con superficie lisa. Mediante la técnica de extracción/evaporación de solvente se obtuvieron microesferas de diferentes tamaños variando la velocidad y el tiempo de homogenización de la emulsión. Las condiciones experimentales, los diámetros medios de partícula (D_p) y las eficiencias de encapsulación se muestran en la Tabla 4.1.

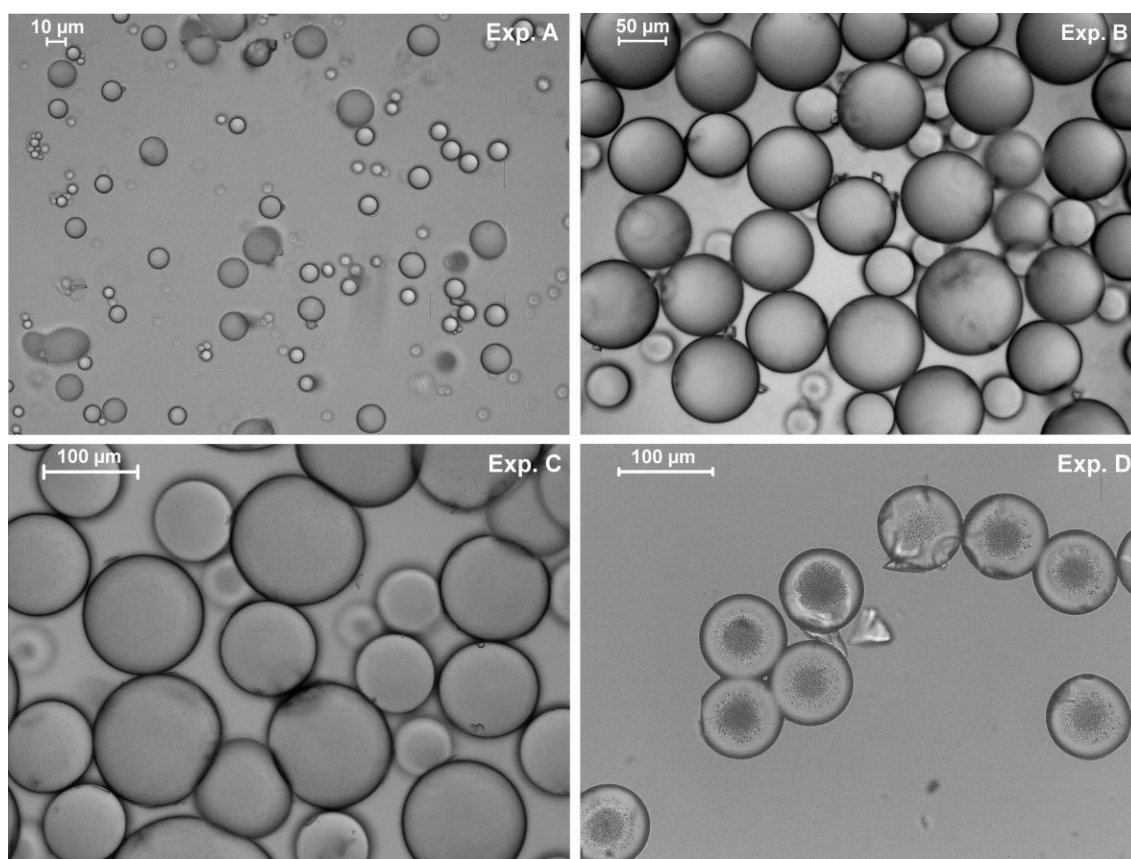


Figura 4.2: Imágenes ópticas de las microesferas de PLGA.

En la Fig. 4.3 se presentan las distribuciones de tamaños de las micropartículas. Se puede observar que las microesferas obtenidas por la técnica de evaporación/extracción de solvente presentan una distribución de tamaños más ancha a medida que se obtienen micropartículas de mayor tamaño. Por otro lado, las microesferas obtenidas por microfluídica presentan una distribución de tamaños más estrecha en comparación con

las anteriores para diámetros de partícula similares. Los valores del coeficiente de variación indican una estrecha distribución de tamaños para el Exp. D. En cuanto a la eficiencia de encapsulación de la droga, ambas técnicas mostraron resultados similares, observándose eficiencias de encapsulación ligeramente mayores para la técnica de evaporación/extracción de solvente.

Tabla 4.1. Condiciones experimentales y características de las micropartículas de PLGA.

	Extracción/evaporación de solvente			Microfluídica
Experimento	A	B	C	D
Velocidad de agitación (rpm)	3000	500	500	-
Tiempo de agitación (min)	30	30	15	-
D_p (μm)	$9,3 \pm 4,4$	$71,6 \pm 19,3$	$131,3 \pm 45,8$	$87,9 \pm 3,6$
Coeficiente de variación (%)	47,3	26,9	34,9	4,1
Carga teórica de droga (% p/p)	20	20	20	20
Eficiencia de encapsulación (%)	78,2	86,3	78,9	70,7

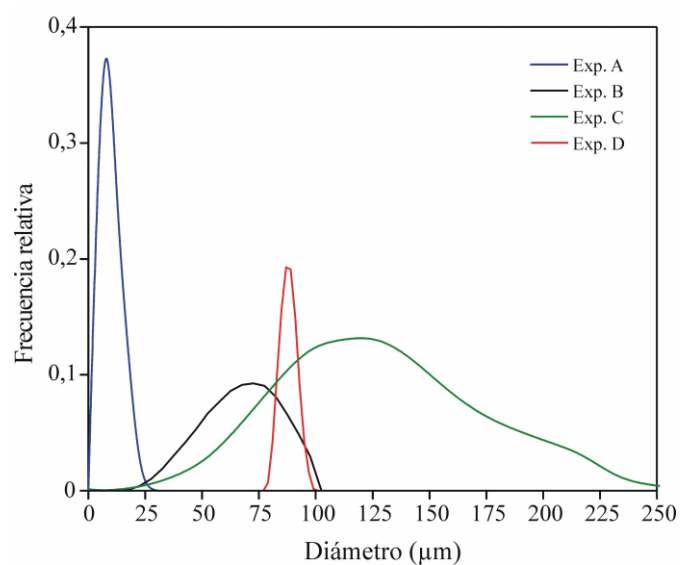


Figura 4.3: Distribuciones de tamaño de partícula de las microesferas de PLGA.

Para obtener microesferas de PLGA por la técnica de microfluídica, en primer lugar se estudió la formación de las emulsiones empleando el dispositivo de microfluídica con un flujo controlado por bombas de jeringa. En la Fig. 4.4 se muestran las imágenes ópticas de las gotas de la emulsión obtenidas para diferentes velocidades de flujo de la fase dispersa, con un caudal fijo de la fase continua. Los tamaños de gotas resultaron similares para velocidades de flujo bajas. Sin embargo, se observó un incremento de los tamaños de gotas para velocidades de flujo cercanas a la de la fase continua.

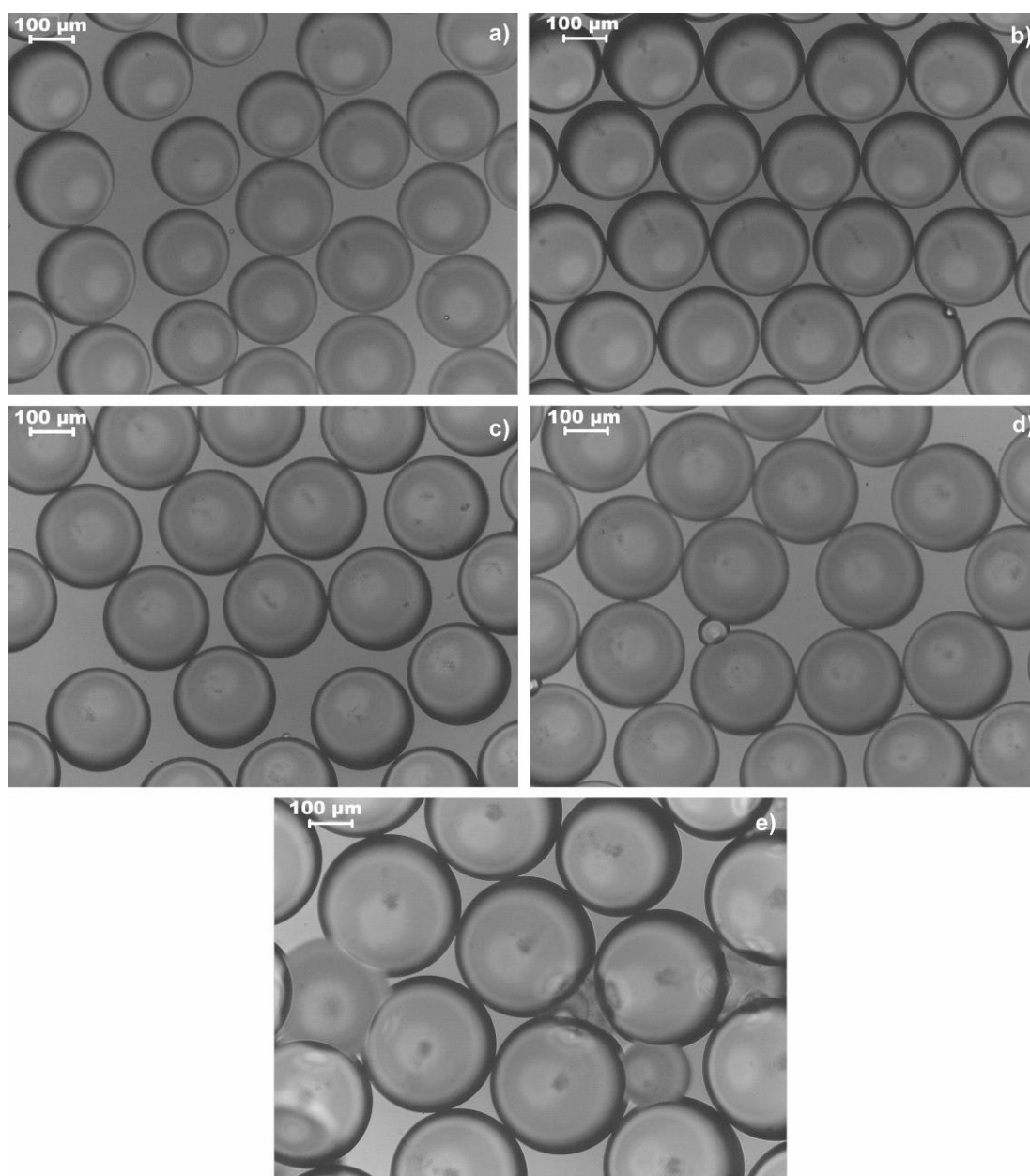


Figura 4.4: Gotas de la emulsión obtenidas mediante el dispositivo de microfluídica con un caudal de fase continua constante ($1020 \mu\text{L h}^{-1}$) y un caudal de fase dispersa variable: a) $150 \mu\text{L h}^{-1}$; b) $300 \mu\text{L h}^{-1}$; c) $450 \mu\text{L h}^{-1}$; d) $600 \mu\text{L h}^{-1}$; e) $1020 \mu\text{L h}^{-1}$.

En la Fig. 4.5 se presentan las imágenes ópticas de las micropartículas sólidas de PLGA para diferentes velocidades de flujo de la fase dispersa, con un caudal fijo de la fase continua. Los tamaños de partícula cambian ligeramente a medida que el caudal de la fase dispersa aumenta en un factor de 10. En la Fig. 4.6 se muestran gráficamente los valores medios de tamaño de gota y de partícula en función de la velocidad de flujo de la fase continua. Además, se muestra la relación entre el tamaño de gota y el tamaño final de partícula.

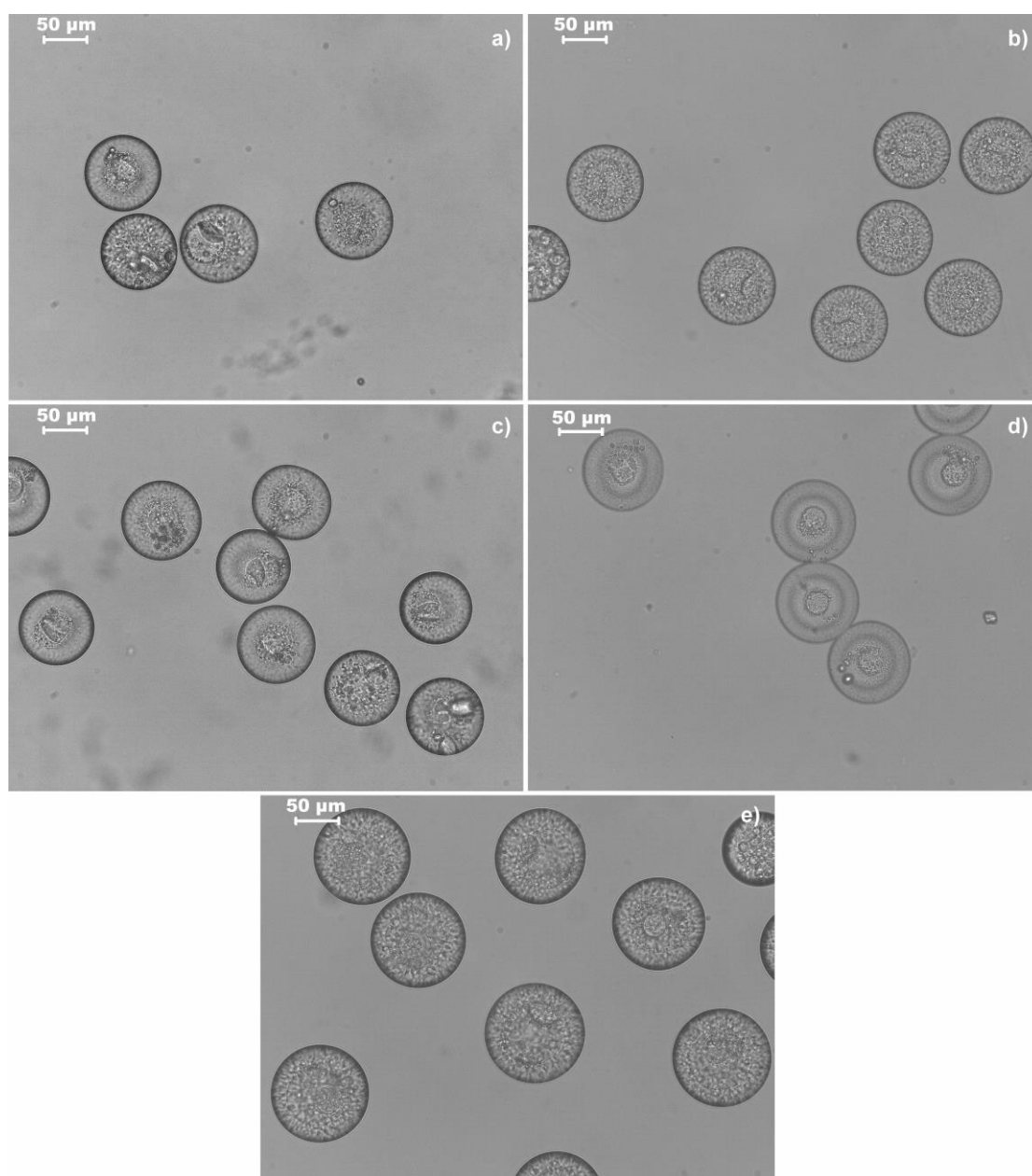


Figura 4.5: Microesferas de PLGA obtenidas mediante el dispositivo de microfluídica con un caudal de fase continua constante ($1020 \mu\text{L h}^{-1}$) y un caudal de fase dispersa variable: a) $150 \mu\text{L h}^{-1}$; b) $300 \mu\text{L h}^{-1}$; c) $450 \mu\text{L h}^{-1}$; d) $600 \mu\text{L h}^{-1}$; e) $1020 \mu\text{L h}^{-1}$.

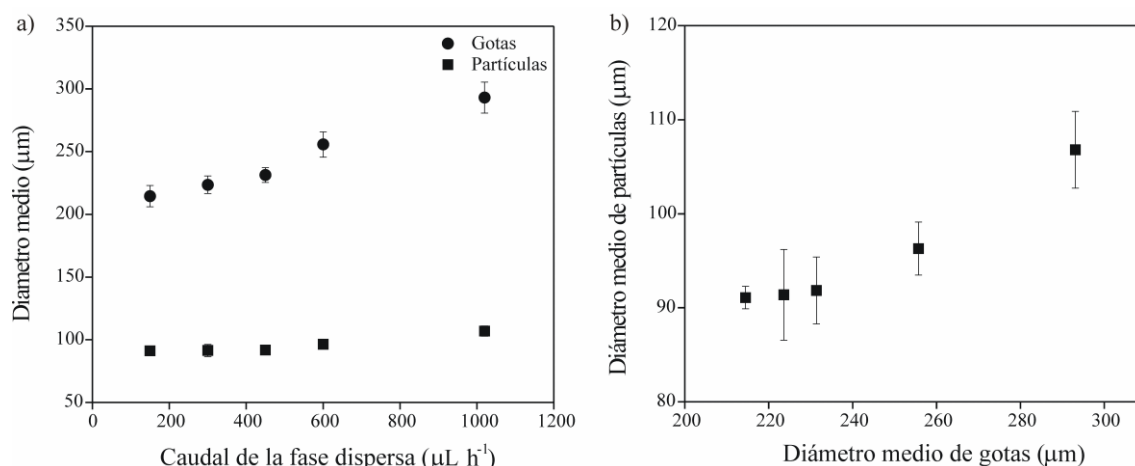


Figura 4.6: a) Diámetro medio de gotas y de micropartículas obtenidas mediante el dispositivo de microfluídica en función de caudal de fase dispersa, empleando un caudal constante de fase continua ($1020 \mu\text{L h}^{-1}$); b) Diámetro medio de partículas en función del diámetro medio de gotas.

Se realizaron estudios de DSC de la progesterona, del PLGA y de las micropartículas de PLGA cargadas con progesterona con el fin de determinar el estado físico de la droga en la matriz polimérica (Fig. 4.7).

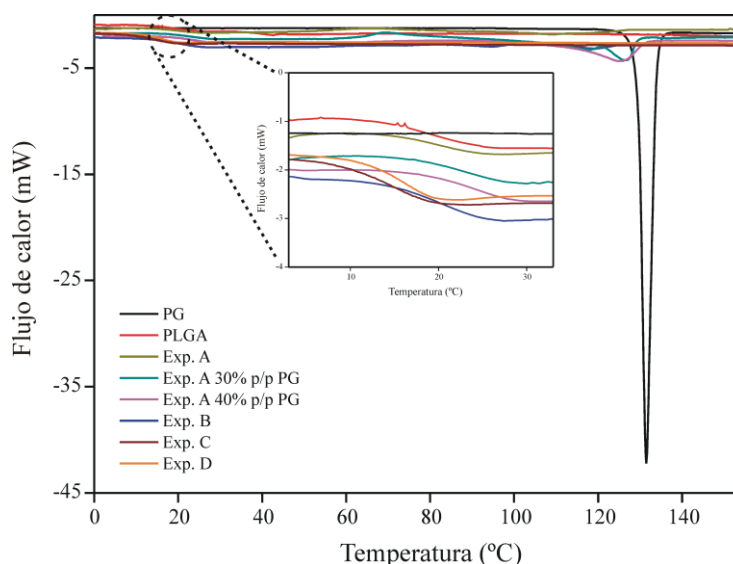


Figura 4.7: Termogramas de DSC de progesterona, PLGA y de las micropartículas de PLGA cargadas con progesterona.

El termograma de la progesterona pura presenta un pico endotérmico pronunciado a 129°C aproximadamente, que corresponde a su punto de fusión. Para las microesferas con una carga de droga del 20% p/p no se observó el pico de fusión correspondiente a la

progesterona, por lo que se puede inferir que la hormona se encuentra en estado amorfo en el interior de la matriz polimérica. Sin embargo, los termogramas de las micropartículas del Exp. A con una carga teórica de progesterona de 30% y 40% p/p presentan un pico de fusión correspondiente a la progesterona, indicando que altas cargas de droga conducen a la formación de cristales en el interior de las partículas. Las diferencias observadas entre las temperaturas de fusión de la progesterona libre y la progesterona encapsulada se deben posiblemente a interacciones de la hormona con la matriz polimérica. Además, se observa que la Tg del PLGA se encuentra alrededor de los 20° C.

Las Figs. 4.8a-b y 4.9a-b muestran los perfiles de liberación *in vitro* de progesterona a partir de microesferas de PLGA con diferentes tamaños de partícula. El tamaño de partícula afecta notablemente los perfiles de liberación y la velocidad de liberación de la hormona. Se puede observar un aumento de la velocidad de liberación para las partículas más pequeñas como consecuencia de los caminos de difusión más cortos (la relación superficie/volumen es mayor para microesferas más pequeñas).

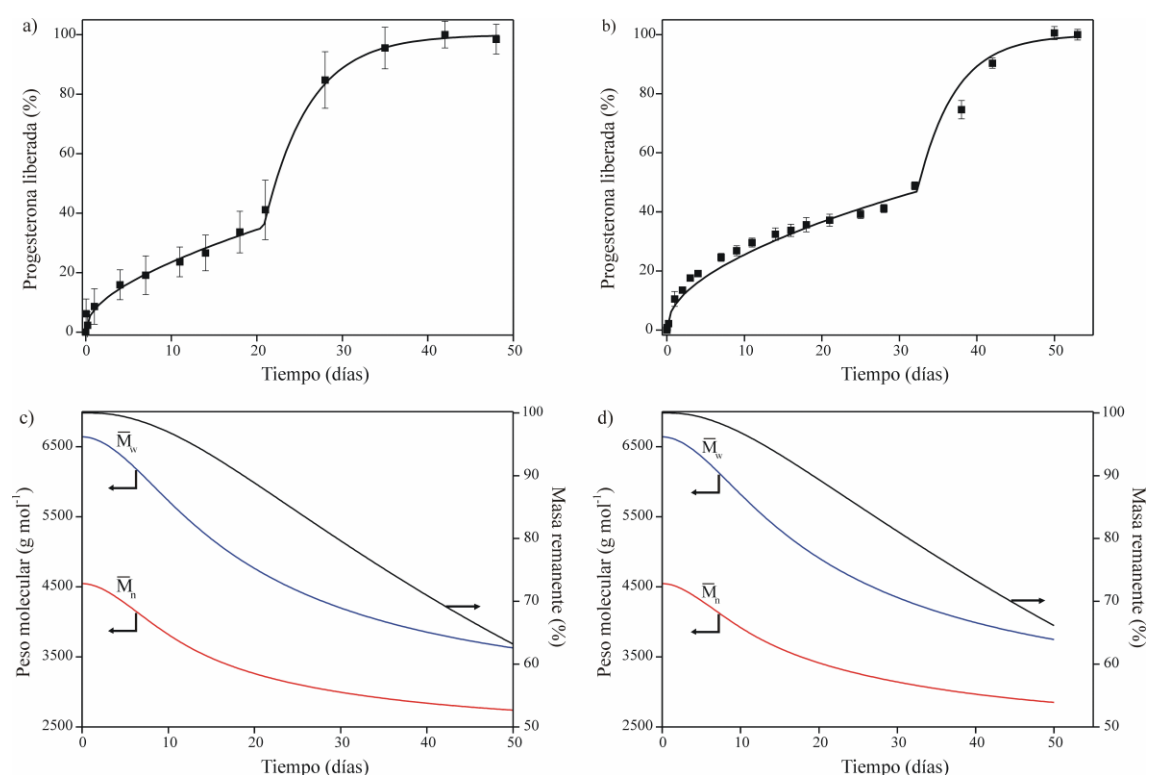


Figura 4.8: Resultados experimentales y teóricos para los Exps. C ($D_p = 131,3 \pm 45,8 \mu m$) y D ($D_p = 87,9 \pm 3,6 \mu m$). a) y b) Perfiles de liberación *in vitro* de progesterona; c) y d) Evoluciones simuladas de pesos moleculares medios y pérdida de masa.

Las microesferas de mayor tamaño (Exps. C y D) presentan un perfil de liberación en tres fases. Inicialmente se observa una alta velocidad de liberación de la hormona (efecto "burst") correspondiente a la droga atrapada en la superficie de las micropartículas durante el proceso de síntesis. A continuación, tiene lugar una etapa de liberación controlada por la difusión de la hormona en la matriz polimérica. Finalmente se observa una etapa en la cual la velocidad de liberación se incrementa rápidamente. Esta etapa final de liberación se atribuye a la degradación del polímero. A medida que el polímero se degrada, el peso molecular disminuye y la partícula se vuelve más porosa debido a la erosión, lo que provoca un rápido aumento del coeficiente de difusión de la droga en la matriz polimérica. Esto da lugar a una mayor velocidad de liberación del fármaco en el denominado tiempo crítico (t^*), en el cual la difusión del fármaco a través de la matriz polimérica no es el mecanismo de transporte preferencial en el proceso de liberación. Esta fase de liberación implica cambios morfológicos relacionados con la estructura porosa de las partículas, provocando la liberación rápida del fármaco encapsulado remanente. Los valores de tiempo crítico para las microesferas de los Exps. C y D fueron de 21 y 32 días aproximadamente. Este resultado está relacionado con el hecho de que el efecto de la autocatálisis es más importante con el aumento del tamaño de partícula.

Las micropartículas obtenidas en el Exp. D mediante microfluídica mostraron un perfil de liberación con una alta reproducibilidad en comparación con las micropartículas preparadas por la técnica convencional de evaporación/extracción de solvente. Además, las micropartículas presentaron una menor liberación inicial comparadas con las obtenidas por el método convencional para diámetros medios de partícula similares. Esto se debe a que presentan una distribución de tamaños estrecha y una morfología controlada. La polidispersidad en tamaños es una de las principales causas de la liberación inicial rápida del fármaco, debido a la presencia de microesferas pequeñas que encapsulan una fracción significativa del fármaco que se libera más rápidamente (Berchane y col., 2007).

Las micropartículas de los Exps. A y B presentan un perfil de liberación en dos fases. Inicialmente se observa una alta velocidad de liberación de la hormona a causa del efecto "burst", seguida por una liberación controlada por la difusión de la hormona en la matriz polimérica. La fase de liberación influenciada por la degradación del polímero no se observó en estos experimentos. Esto se debe a que la liberación total de la hormona encapsulada tiene lugar en unos pocos días, durante los cuales los efectos de

degradación de la matriz polimérica no son importantes. Además, la degradación del polímero procede a una velocidad más lenta para microesferas más pequeñas debido al efecto de autocatálisis.

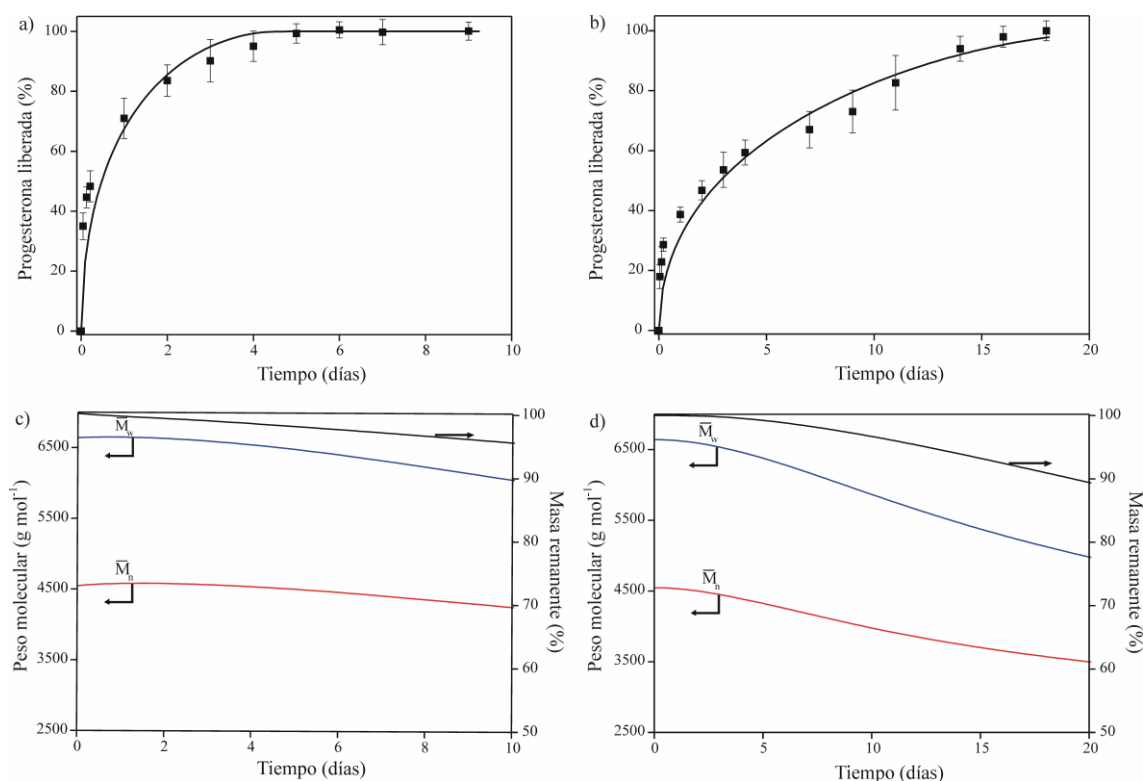


Figura 4.9: Resultados experimentales y teóricos para los Exps. A ($D_p = 9,3 \pm 4,4 \mu m$) y B ($D_p = 71,6 \pm 19,3 \mu m$). a) y b) Perfiles de liberación *in vitro* de progesterona; c) y d) Evoluciones simuladas de pesos moleculares medios y pérdida de masa.

Los resultados de simulación del Módulo de Degradación y la predicción de la liberación de progesterona a partir de las diferentes micropartículas de PLGA también se presentan en las Figs. 4.8 y 4.9. Para las simulaciones correspondientes al Módulo de Degradación se utilizaron los parámetros ajustados en el capítulo anterior. Se pueden identificar tres etapas a partir de las evoluciones de pesos moleculares medios para las micropartículas de los Exps. C y D. Inicialmente la degradación avanza lentamente debido a la baja concentración de grupos de ácidos carboxílicos terminales. A medida que avanza la degradación, el número de grupos de ácido carboxílico aumenta y acelera la reacción de hidrólisis. Finalmente, la baja concentración de enlaces éster retrasa la degradación. Para las micropartículas de los Exps. A y B sólo se identifican dos etapas en las evoluciones de los pesos moleculares medios debido a que el proceso de

liberación tiene lugar en un corto período durante el cual los efectos de degradación del polímero son despreciables. Además, puede observarse que la degradación de las microesferas aumenta con el tamaño de partícula a causa del efecto de autocatálisis. El efecto del tamaño de partícula en los perfiles de degradación está relacionado con el hecho de que los productos de degradación generados dentro de las partículas más pequeñas pueden difundir fácilmente a la superficie de las partículas y disolverse en el medio, mientras que para las partículas más grandes la longitud de difusión es mayor. Por lo tanto, los productos de degradación se acumulan dentro de la micropartícula y tienen el potencial de catalizar la degradación de la matriz polimérica. Los valores de t^* para las micropartículas de los Exps. C y D fueron de 21 y 32 días, respectivamente. Este parámetro varía según el tamaño medio de partícula, ya que los efectos de la autocatálisis se hacen más importantes a medida que aumenta el tamaño de las microesferas. A partir de las evoluciones simuladas de \overline{M}_n y \overline{M}_w es posible estimar un rango de pesos moleculares a partir del cual cambia el mecanismo de transporte de materia. Los rangos estimados de \overline{M}_n y \overline{M}_w fueron de 3100-3200 y 4300-4700 g mol⁻¹, respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con datos reportados en condiciones experimentales similares (Berchane y col., 2007; Raman y col., 2005).

La pérdida de masa de las micropartículas aumenta con el tamaño de partícula. En todos los experimentos se observó una baja pérdida de masa (<10%) durante los primeros 5 días, seguido por un incremento progresivo de la pérdida de masa. Esto puede explicarse por el hecho de que el polímero debe sufrir una degradación suficientemente extensa para producir monómeros y oligómeros solubles en agua, por lo que no se observa reducción de la masa al comienzo del experimento de degradación. Para las micropartículas de los Exps. A y B se observó una baja pérdida de masa debido a que la completa liberación del fármaco tiene lugar en un corto período durante el cual la generación de oligómeros solubles en agua es despreciable.

El Módulo de Liberación se utilizó para simular el proceso de liberación de progesterona. Para este fin, el modelo se ajustó y validó con los datos experimentales. Para las microesferas de los Exps. A y B, la constante cinética k_a y los parámetros de transporte D_{PG}^0 y k_D se ajustaron simultáneamente para simular los perfiles de liberación de progesterona. Para las microesferas de los Exps. C y D se ajustó la constante cinética k_d . Los valores de los datos de entrada, las constantes cinéticas y los parámetros de transporte utilizados para ajustar el modelo se muestran en la Tabla 4.2. En las Figs.

4.8a-b y 4.9a-b se presentan los resultados de simulación. Se observó una muy buena concordancia con los resultados experimentales. El coeficiente de difusión efectivo inicial de la progesterona varió con la carga de fármaco de las micropartículas y los valores están en acuerdo con los reportados para matrices de PLA en condiciones similares (Pitt y col., 1979). El incremento de la difusividad efectiva del fármaco durante la degradación de la matriz polimérica se relacionó con las evoluciones de \overline{M}_w y con el parámetro de ajuste k_D . Esto permitió acoplar la evolución de la porosidad de la partícula a la difusividad efectiva. Por otra parte, el valor de k_a fue el mismo para todos los experimentos, indicando que la distribución de la fase amorfa en la matriz polimérica no varía con el tamaño de partícula.

Tabla 4.2. Datos de entrada, constantes cinéticas y parámetros de transporte del modelo.

C_{PG_m} (mg cm ⁻³) (Turino, 2012)	25
k_a (s ⁻¹)	1.0 x 10 ⁻²
k_d (s ⁻¹)	2.3 x 10 ⁻⁶
D_{PG}^0 (cm ² s ⁻¹)	1.2 x 10 ⁻¹² (Exp. A)
	9.8 x 10 ⁻¹² (Exp. B)
	1.8 x 10 ⁻¹² (Exp. C)
	9.0 x 10 ⁻¹³ (Exp. D)
D_{PG_b} (cm ² s ⁻¹) (Sieminska y col., 1997)	1.0 x 10 ⁻⁸
k_D	2.5

Otras simulaciones teóricas se muestran en la Fig. 4.10. Se estudió el efecto del tamaño de partícula y del peso molecular inicial del polímero sobre los perfiles de liberación de progesterona. La Fig. 4.10a muestra los perfiles de liberación simulados para microesferas de diferentes tamaños. Se puede observar que la velocidad de liberación disminuye con el incremento del tamaño de partícula y que los efectos de degradación del polímero son despreciables para las microesferas con un tamaño inferior a 75 μ m. Las micropartículas de mayor tamaño muestran un perfil de liberación trifásico y los valores de t^* varían con el tamaño de partícula, siendo menores a medida que el tamaño

de partícula aumenta debido a que la degradación del polímero es más rápida para micropartículas más grandes. La Fig. 4.10b muestra los perfiles de liberación simulados en función del peso molecular inicial del polímero para microesferas con diámetros medios de 50 y 100 μm . Las micropartículas con un tamaño de 50 μm presentan perfiles de liberación bifásicos para todos los pesos moleculares estudiados. Esto se debe a que los efectos de degradación del polímero son despreciables en el período de liberación, y la difusión del fármaco a través de la matriz polimérica es el principal mecanismo de transporte. Por otra parte, las microesferas con un tamaño de 100 μm muestran un perfil de liberación influenciado por la degradación de la matriz polimérica. Los valores de t^* varían según el peso molecular inicial del polímero. La degradación del polímero con un peso molecular bajo ocurre a tiempos menores ya que los oligómeros pueden alcanzar rápidamente el peso molecular requerido para disolverse en el medio.

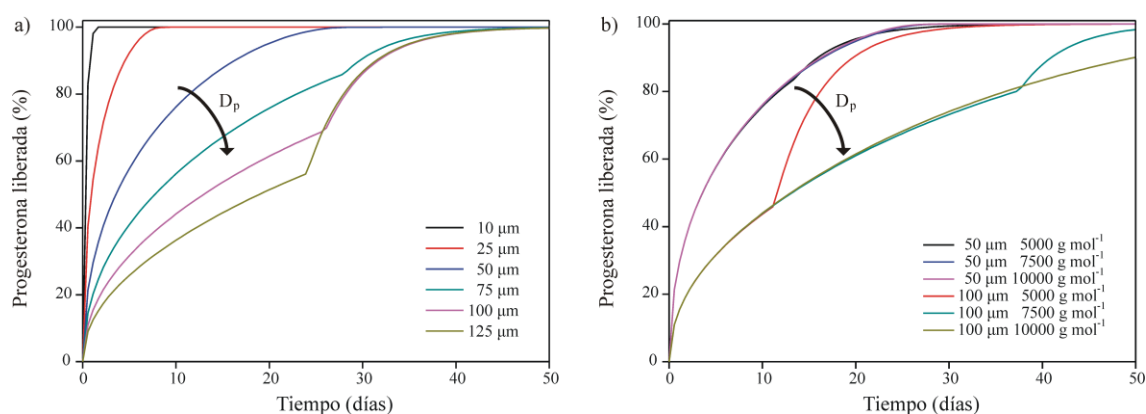


Figura 4.10. Efecto teórico del tamaño de partícula y del peso molecular inicial del polímero sobre los perfiles de liberación *in vitro* de progesterona. a) Efecto del tamaño de partícula; b) Efecto del peso molecular inicial del polímero.

4.4 Conclusiones

Se prepararon microesferas de PLGA cargadas con progesterona por las técnicas de extracción/evaporación de solvente y microfluídica. Las microesferas fueron caracterizadas en cuanto a distribución de tamaños, morfología, carga de droga y propiedades térmicas de la matriz polimérica y de la droga. Se investigó el efecto del tamaño de las microesferas, la polidispersidad y la degradación del polímero sobre la velocidad de liberación de la hormona. Las microesferas de menor tamaño mostraron un perfil de liberación bifásico, comprendiendo una liberación inicial caracterizada por el efecto “burst” y una liberación controlada por la difusión de la droga en la matriz polimérica. Por otro lado, las partículas de mayor tamaño presentaron un perfil de liberación trifásico, incluyendo una fase adicional de liberación controlada por la degradación de la matriz polimérica. Este comportamiento se debe a que la liberación del fármaco en las micropartículas más pequeñas tiene lugar en unos pocos días, durante los cuales los efectos de degradación del polímero son aún despreciables. Las microesferas preparadas por microfluídica presentaron una distribución de tamaños estrecha y mayor reproducibilidad en los ensayos de liberación de progesterona *in vitro*. Se formuló un modelo matemático para predecir la liberación de progesterona a partir de las microesferas de PLGA con diferentes diámetros medios. El modelo tiene en cuenta la disolución y la difusión intrapartícula de la hormona, así como también el efecto autocatalítico de degradación de la matriz polimérica. Los resultados de simulación presentan una muy buena concordancia con los resultados experimentales. El modelo puede emplearse para seleccionar un tamaño de partícula y/o un peso molecular del polímero apropiado para alcanzar un perfil de liberación deseado de acuerdo con la terapia.

Capítulo 5

Microgeles de ácido hialurónico para la liberación controlada de progesterona

5.1 Introducción

5.1.a Microgeles en liberación controlada de drogas

En los últimos años, los microgeles han recibido considerable atención debido a su gran potencial en biomedicina, y en particular como sistemas de administración de fármacos (Smeets y Hoare, 2013). Los microgeles se definen como partículas poliméricas entrecruzadas que poseen gran capacidad de absorber y retener agua en su estructura. Estos materiales son de gran interés debido a su facilidad de síntesis y de control de su estructura física y química, a sus buenas propiedades mecánicas y a su excelente biocompatibilidad (Oh y col., 2008). Además, estas partículas blandas presentan capacidad de respuesta a estímulos. De hecho, sus propiedades de hinchamiento se rigen por el equilibrio entre las presiones osmóticas interior y exterior de la fase gel. Por lo tanto, cualquier desequilibrio entre estas presiones induce hinchamiento o contracción. Tal modificación puede ser desencadenada por parámetros externos que actúan sobre la solubilidad de la red polimérica, su densidad de carga o su densidad de entrecruzamiento. La modulación del estado de hinchamiento provoca a su vez una modificación de la mayoría de las propiedades físicas del microgel, tales como su peso (contenido de agua), propiedades ópticas (por ejemplo, índice de refracción), propiedades mecánicas (elasticidad), o incluso su porosidad (Saunders, 2004). Estas propiedades son de enorme interés en las aplicaciones de administración de fármacos, ya que los microgeles pueden entrapar una molécula y liberarla a una velocidad que depende de su difusión a través de la red polimérica. Por lo tanto, la velocidad de liberación puede ser modulada no sólo por el tamaño de la red y su grado de entrecruzamiento, sino también por la aplicación de un estímulo externo.

Para ser utilizado como sistemas de liberación de fármacos, los microgeles deben cumplir los criterios de biocompatibilidad y de biodegradabilidad. En otras palabras, la matriz debe ser segura, no generar respuestas inmunes excesivas, poseer biocompatibilidad aceptable, no ser tóxica, y debe ser eliminada de manera controlada (Oh y col., 2009). La biodegradabilidad puede aplicarse a dos propósitos principales: la matriz de hidrogel puede ser degradada después de que la partícula ha liberado su carga o es posible emplear la degradación como mecanismo para desencadenar la liberación del fármaco.

5.1.b Ácido hialurónico

El ácido hialurónico (AH) es un glicosaminoglicano de origen natural compuesto por unidades de N-acetil-D-glucosamina y ácido D-glucurónico (Fig. 5.1). Este polisacárido lineal es ubicuo en todos los tejidos ya que es uno de los componentes principales de la matriz extracelular en los tejidos animales (Laurent, 1998). Tiene importantes funciones estructurales y biológicas, incluyendo la proliferación celular, la diferenciación, la morfogénesis, la inflamación y la cicatrización de heridas (Meyer, 1958). El AH es abundante en la naturaleza, renovable y biocompatible, y además puede ser fácilmente modificado químicamente. El AH es escindido *in vivo* por enzimas hialuronidasas y es completamente reabsorbido a través de múltiples vías metabólicas. Por lo tanto, el AH ha sido ampliamente utilizado para diseñar matrices entrecruzadas con potenciales aplicaciones en la regeneración de tejidos, la liberación controlada de drogas o el crecimiento celular (Leach y col., 2003; Jia y col., 2006; Burdick y col., 2005; Khan y col., 2009). El AH puede ser modificado a través de la incorporación de grupos entrecruzantes, tales como glutaraldehído, divinilsulfona, grupos tiol o derivados funcionales metacrilato para obtener una matriz entrecruzada (Leach y col., 2003; Jia y col., 2006; Ilgin y col., 2010). En el caso de los grupos funcionales metacrilato, la polimerización puede llevarse a cabo mediante iniciación por temperatura, redox o UV. El entrecruzamiento de una cadena de polímero a través de fotopolimerización ha sido explorado por muchos investigadores como una ruta conveniente para la gelificación *in situ* (Raemdonck y col., 2009). La fotopolimerización permite tanto el control espacial como temporal del entrecruzamiento y puede ser realizada a temperatura ambiente a diferencia del entrecruzamiento térmico.

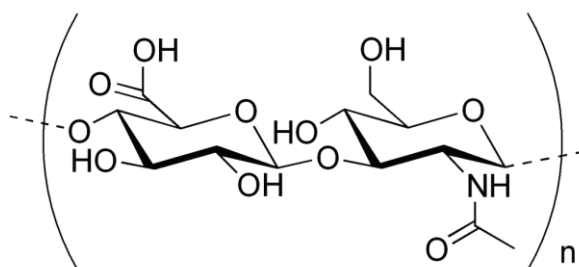


Figura 5.1: Estructura química del ácido hialurónico.

En este capítulo se estudia la síntesis de microgeles biodegradables monodispersos de AH para la encapsulación de fármacos hidrofóbicos mediante una estrategia basada en microfluídica. El enfoque se basa en: (i) la generación de una nanoemulsión primaria aceite/agua (O/W) por el método de ultrasonificación, (ii) la formación de una doble emulsión aceite/agua/aceite (O/W/O) mediante el empleo de un dispositivo de microfluídica, y (iii) entrecruzamiento de los microgeles por fotopolimerización de los precursores de AH modificados con grupos metacrilatos (AH-MA) presentes en la fase acuosa de las microgotas. El procedimiento se utiliza para la encapsulación y liberación controlada de progesterona. Se realizan estudios de degradabilidad y encapsulación/liberación en buffer PBS a 37 °C en presencia de diferentes concentraciones de hialuronidasas. Los resultados obtenidos en este capítulo fueron publicados en una revista científica internacional [Busatto y col. (2017), “Oil-in-microgel strategy for enzymatic-triggered release of hydrophobic drugs”, *Journal of Colloid and Interface Science* 493, 356-364].

5.2 Trabajo experimental

5.2.1 Materiales

Todos los reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich y se utilizaron sin purificación adicional: anhídrido metacrílico (AMA), N,N-dimetilformamida (DMF), etanol, n-hexadecano (HD), octadeciltriclorosilano (OTS), cloroformo, tolueno, hexano, aceite de soja, monooleato de sorbitán (Span 80), polisorbato 80 (Tween 80), hialuronidasa de testículo bovino (tipo I-S), N,N'-metilenbisacrilamida (BIS), caseinato de sodio (CS), 1-[4-(2-hidroxietoxi) fenil]-2-hidroxi-2-metil-1-propanol-1-ona (Irgacure 2959), n-isopropilacrilamida (NIPAm), progesterona y solución de buffer fosfato (PBS). El ácido hialurónico ($\overline{M}_w = 60000 \text{ g mol}^{-1}$) se adquirió de Lifecore (USA).

5.2.2 Metodología

5.2.2.a Síntesis del ácido hialurónico metacrilado (AH-MA)

La síntesis del ácido hialurónico modificado con grupos metacrilatos se llevó a cabo según el procedimiento reportado por Hachet y col (2012). Brevemente, se solubilizó 1 g de ácido hialurónico (2% p/p) a temperatura ambiente en agua ultrapura durante 4 horas. Luego se añadió DMF gota a gota a la solución (hasta alcanzar una relación volumétrica 3:2 agua-DMF) y la mezcla se enfrió a 4 °C. A continuación, se adicionó AMA (1 equivalente molar con respecto a los moles de la unidad repetitiva de AH) gota a gota manteniendo el pH de la solución entre 8 y 9 durante 4 horas mediante la adición de NaOH 0,5 M. La reacción se llevó a cabo durante la noche y a continuación, se añadió una solución de NaCl 0,5 M a la mezcla. El polímero se precipitó mediante la adición de etanol, empleando una relación volumétrica 2:3 agua-etanol. Luego de la eliminación del sobrenadante, el precipitado se lavó sucesivamente con mezclas de agua-etanol con relaciones volumétricas de 3:7, 1:4 y 1:9. El precipitado final se disolvió en agua ultrapura y se purificó por diálisis en agua ultrapura por un período de 3 días. El producto purificado se recuperó por liofilización y se caracterizó por análisis de ^1H -RMN.

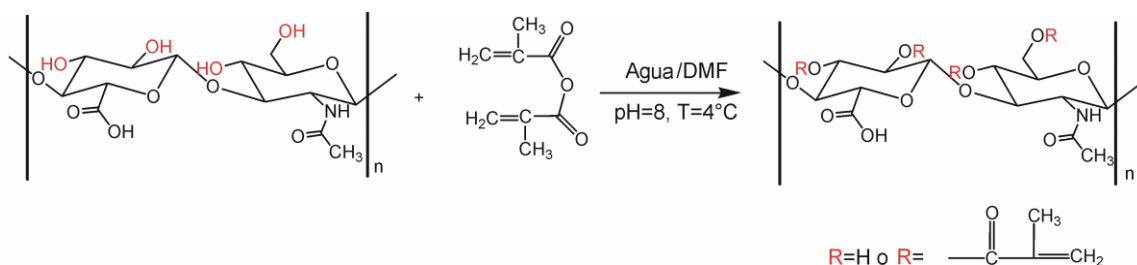


Figura 5.2: Esquema de la reacción de síntesis del ácido hialurónico metacrilado.

5.2.2.b Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H -RMN).

El grado de metacrilación (DM) se determinó a partir de espectros de ^1H -NMR (espectrómetro Bruker 400 MHz) en D_2O ($C = 8 \text{ mg mL}^{-1}$) a 80°C mediante la integración digital de la señal correspondiente a los protones de los grupos metacrilatos a 6,4 o 6,7 ppm respecto a la señal de los protones anoméricos del AH a 5,1 y 5,3 ppm. La determinación se realizó a 80°C con el fin de desplazar el pico de agua hacia desplazamientos químicos inferiores, evitando de esta manera su superposición con los picos correspondientes a los protones anoméricos del AH.

5.2.2.c Preparación y caracterización de la emulsión primaria

La fase acuosa de las emulsiones consistió en 2 mL de agua ultrapura conteniendo un agente tensioactivo, y la fase aceite consistió en hexadecano o aceite de girasol al 20% p/p. El tensioactivo utilizado fue Tween 80 o CS en diferentes concentraciones. Ocasionalmente se empleó una solución de Nile Red en hexadecano (con una concentración de $3,1 \times 10^{-4} \text{ M}$) como fase aceite para permitir la inspección visual del compuesto hidrofóbico encapsulado. Las emulsiones se prepararon mediante ultrasonificación durante 20 min (1 min encendido y 1 min apagado), empleando un sonicador de sonda. La solución se enfrió en un baño de agua helada durante todo el proceso de sonicación. El diámetro promedio y la estabilidad de las emulsiones se estudiaron por la técnica de dispersión de luz dinámica empleando un equipo Zetasizer NanoZS Malvern Instruments operando con un láser de He-Ne a 173° .

5.2.2.d Preparación de los microgeles de AH-MA

Para la preparación de los microgeles se utilizó un dispositivo de microfluídica con geometría “co-flow”. Como se muestra en la Fig. 5.3, el sistema se encuentra formado

por dos tubos capilares concéntricos de sílice fundida (denominados tubo 1 y tubo 2) y una unión en T. El tubo 1 (diámetro interior: 75 μm ; diámetro exterior: 148 μm) asociado con un acoplador capilar (1/16'', diámetro interior: 180 μm) se insertó dentro de la unión en T (1/16'') a lo largo de su eje principal. Este tubo atraviesa la unión en T y finaliza en el centro del tubo 2 (diámetro interior: 250 μm ; diámetro exterior: 356 μm). La unión en T permite la inyección de la fase líquida dispersa en la fase continua. La superficie interior del tubo 2 se modificó con el fin de aumentar su hidrofobicidad. Para este efecto, se inyectaron 3 mL de una solución diluida de OTS en dodecano (1% p/p) a través del capilar de sílice a una velocidad de flujo de 6 mL h⁻¹. A continuación, el capilar se lavó con una mezcla de 5 mL de tolueno y 5 mL de cloroformo.

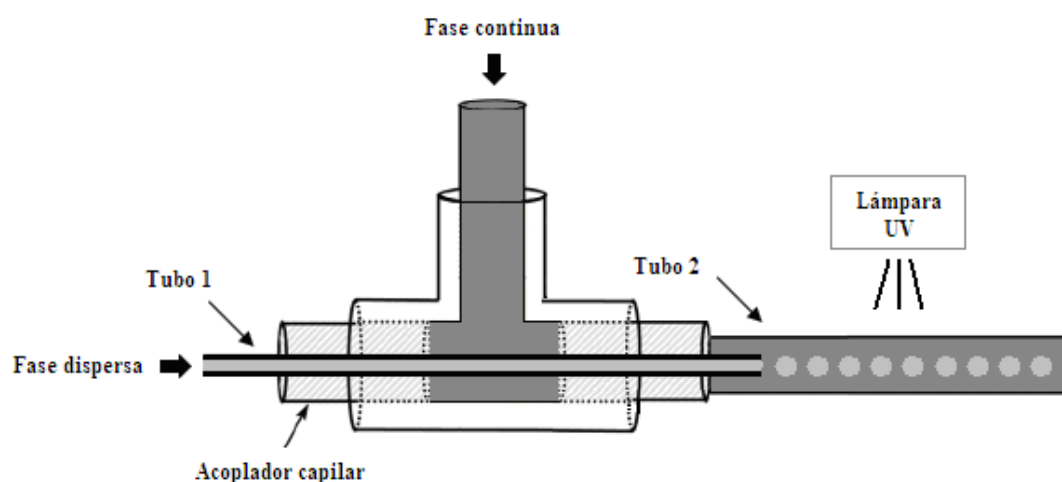


Figura 5.3: Dispositivo de microfluídica empleado para la preparación de los microgeles.

Como fase continua se utilizó aceite de soja conteniendo 2% p/p de Span 80. Por separado, se disolvió el macrómero de AH-MA (3% p/p) en agua salina (0,2 M NaCl) conteniendo 0,2% p/p de fotoiniciador (Irgacure 2959), y eventualmente 2% p/p de BIS, y la solución se mezcló en volúmenes iguales con la emulsión primaria para formar la fase dispersa.

Alternativamente, se preparó una solución acuosa conteniendo 10% p/p de NIPAm y 0,2% p/p de BIS. Esta solución se mezcló con la fase aceite (HD al 10% p/p conteniendo Nile Red) para preparar la emulsión. El fotoiniciador dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) diclorhidrato se añadió a la emulsión luego de su

preparación. La solución resultante se utilizó como fase dispersa en el dispositivo de microfluídica.

Las fases dispersa y continua se inyectaron en el dispositivo de microfluídica utilizando bombas de jeringa y las velocidades de flujo fueron de $3 \mu\text{L min}^{-1}$ y $6 \mu\text{L min}^{-1}$, respectivamente. La polimerización se llevó a cabo colocando el dispositivo bajo una lámpara UV (Hamamatsu LC8, L9588-06). La irradiación UV ($\lambda = 300$ a 450 nm , centrada en $365 \mu\text{m}$) se dirigió a una ventana sin protección de 20 mm en el tubo 2, y el tiempo de irradiación fue de $6,5$ segundos aproximadamente. La lámpara se utilizó al 100% de su potencia. Los microgeles se separaron de la fase continua mediante centrifugación a 800 rpm durante 10 min y se lavaron dos veces en hexano y luego dos veces en agua ultrapura para eliminar el aceite remanente. La preparación de los microgeles se representa esquemáticamente en la Fig. 5.4.

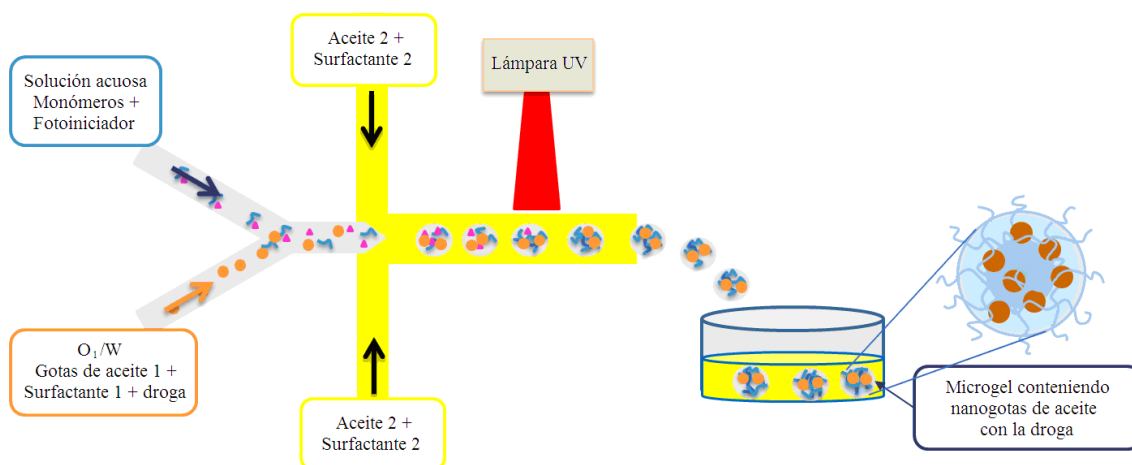


Figura 5.4: Representación esquemática de la obtención de los microgeles conteniendo nanogotas de aceite mediante microfluídica.

5.2.2.e Estudios de degradación enzimática con hialuronidasas

Se investigó la biodegradabilidad de los microgeles por la acción de enzimas hialuronidasas utilizando un microscopio óptico Leica (Leica DMI 600 B) acoplado con una cámara para la toma de imágenes. Los microgeles se observaron en una cámara de inmersión empleando una micropipeta para inmovilizar los microgeles por succión. La incubación se realizó a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en buffer PBS ($\text{pH} = 7,4$) conteniendo 300 UI mL^{-1} de hialuronidasas tipo I-S y 1% p/p de Tween 80.

5.2.2.f Encapsulación y liberación de progesterona

Con el propósito de encapsular la hormona se utilizó una solución de progesterona en aceite de girasol (0,06 M) para preparar la emulsión primaria. Se investigó la liberación de la hormona provocada por la degradación enzimática de los microgeles empleando hialuronidasas. Para el ensayo se emplearon microgeles colectados durante 10 min en el dispositivo de microfluídica y se incubaron a 37 °C en presencia de diferentes concentraciones de hialuronidasas en 150 µL de buffer PBS conteniendo 1% p/p de Tween 80. Se tomaron alícuotas de 20 µL de la solución a diferentes tiempos y se mezclaron con 480 µL de etanol. La concentración de progesterona se analizó por HPLC con detección UV por arreglo de diodos, a una longitud de onda de 254 nm. Se empleó metanol/agua (95:5) como fase móvil, a una velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹.

5.3 Resultados y discusión

5.3.a Caracterización del macrómero de AH-MA

El grado de metacrilación determinado por ^1H -RMN fue de 10,56%. En la Fig. 5.5 se muestra el espectro de ^1H -RMN del AH-MA.

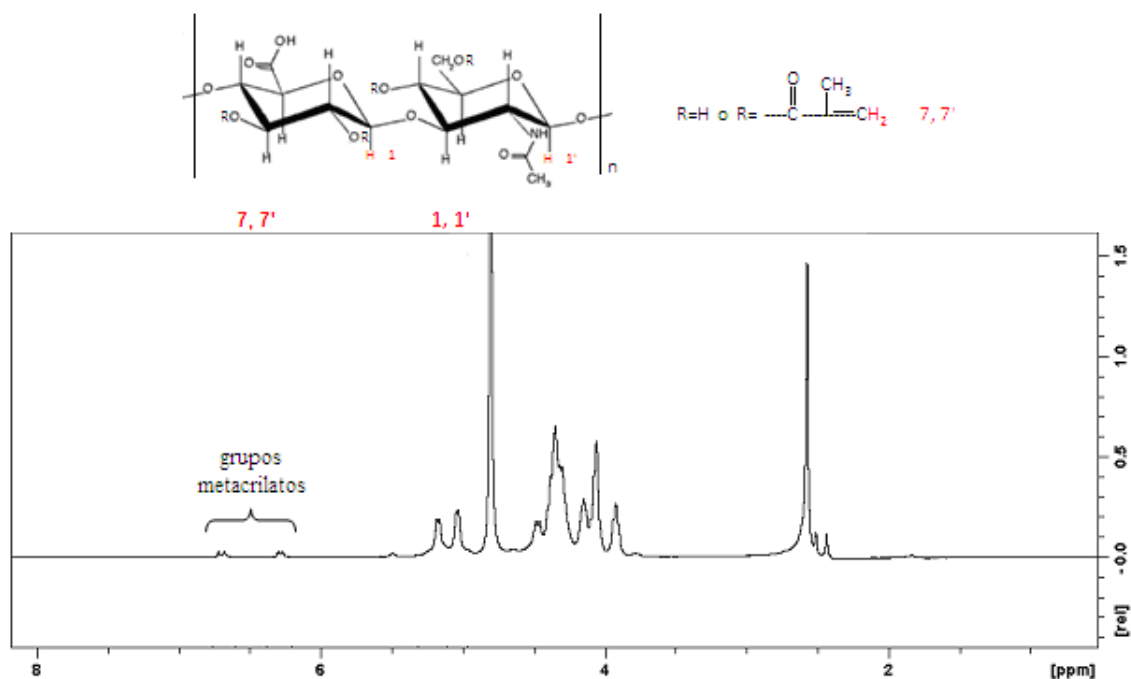


Figura 5.5: Espectro de ^1H -RMN del AH-MA.

5.3.b Preparación de los microgeles por microfluídica

Las gotas de aceite de la emulsión primaria deben poseer un tamaño de al menos un orden de magnitud menor que las gotas de la doble emulsión para permitir su encapsulación. Por lo tanto, se prestó atención en generar gotas con el menor tamaño posible. Se utilizó un método de emulsión de alta energía para producir la nanoemulsión primaria aceite/agua (O1/W). Por simplicidad, se escogió la ultrasonificación. Sin embargo, esta técnica podría reemplazarse por la homogeneización a alta presión si se utilizan moléculas frágiles. Se prepararon un primer conjunto de nanoemulsiones utilizando hexadecano como fase dispersa (10% p/p) y Tween 80 como agente tensioactivo en la fase acuosa (5% p/p). Inmediatamente después de la preparación, el diámetro medio de las gotitas de hexadecano en solución acuosa fue de 140 nm y el índice de polidispersidad fue cercano a 0,22 (Fig. 5.6). El tamaño de las gotitas aumentó

y alcanzó un valor estable de 180 nm después de 1 día. Al mismo tiempo, el índice de polidispersidad disminuyó de 0,22 a 0,1. Esta tendencia sugiere que la emulsión experimentó el proceso maduración de Oswald, es decir, la difusión de las gotas pequeñas hacia las más grandes debido a la diferencia de presión de Laplace. Con el tiempo, la distribución del tamaño se torna más estrecha y la difusión disminuye. Después de un día, el tamaño permanece constante.

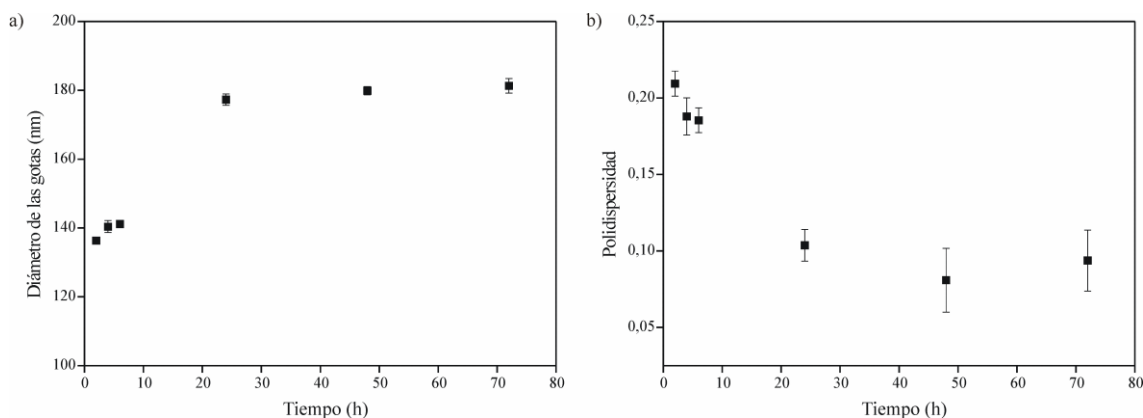


Figura 5.6: Características de la emulsión O1/W (O1= hexadecano, W= solución acuosa de Tween 80): a) Evolución del diámetro medio de gota; b) Evolución del índice de polidispersidad.

Luego de 1 día de preparación, la nanoemulsión O1/W se mezcló con la solución que contiene los precursores entrecruzables de AH. Este último componente se añadió posteriormente a la preparación de la emulsión por dos razones principales: en primer lugar debido a que aumenta la viscosidad de la solución, lo cual puede cambiar las condiciones de emulsificación; en segundo lugar, las moléculas de AH son frágiles y pueden degradarse bajo ultrasonificación (Kubo y col., 1993). La concentración de los macrómeros de AH-MA en la fase acuosa continua de la nanoemulsión fue de 15 g L⁻¹. También se introdujo un fotoiniciador en la solución. Se utilizó Irgacure 2959 como fotoiniciador por su conocida biocompatibilidad con las células (Bryant y col., 2000).

Las condiciones para preparar los microgeles a partir de los precursores de AH-MA se ensayaron por separado, en ausencia de la nanoemulsión O1/W. La fase acuosa que contiene los macrómeros y el fotoiniciador se introdujo directamente en el dispositivo de microfluídica utilizando una bomba de jeringa y se emulsionó en la fase continua de aceite de soja conteniendo Span 80. Los caudales de las fases dispersa y continua fueron de 3 $\mu\text{L min}^{-1}$ y 6 $\mu\text{L min}^{-1}$, respectivamente. En estas condiciones, las gotas se

produjeron una por una en un régimen de compresión, es decir, un régimen en el que las gotas son comprimidas por el capilar y se deforman (Fu y col., 2010). Después de la irradiación, las gotas se recogieron en un vial. Como era de esperar, en ausencia de precursor fotopolimerizable o de fotoiniciador, las gotas eran inestables y se produjo separación de fases. En presencia de AH-MA y del fotoiniciador, se observaron partículas acuosas en el fondo del vial y no se observó agregación de partículas. Los microgeles obtenidos fueron monodispersos y con forma alargada (Fig. 5.7). También se obtuvo una forma similar con una matriz de pNIPAM, en la que el AH-MA se reemplazó por una mezcla de NIPAM (10% p/p) y BIS (0,2% p/p) (Fig. 5.8a y b). Esto significa que el cambio de la relación de viscosidad entre la fase dispersa y la fase continua no alteró significativamente la forma de las gotas. Note que la solución NIPAM tiene una viscosidad próxima a la del agua, mientras que una solución de HA-MA a una concentración de 15 g L^{-1} tiene una viscosidad 15 veces mayor.

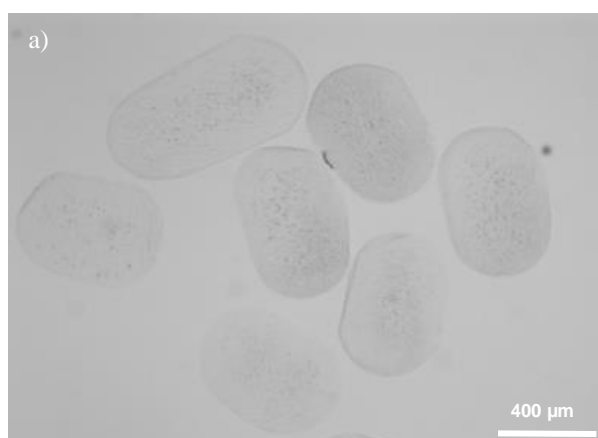


Figura 5.7: Microgeles de AH-MA preparados sin la nanoemulsión O1/W.

La encapsulación de nanogotas de aceite se optimizó en primera instancia con el sistema de pNIPAM. La fase acuosa fue reemplazada por la nanoemulsión conteniendo los precursores polimerizables. Los microgeles compuestos se obtuvieron con éxito, como lo demuestra su estructura interna heterogénea (Fig. 5.8c). Las nanogotas de aceite encapsuladas no pudieron ser observadas directamente por microscopía óptica debido a que su tamaño se encuentra por debajo de los 200 nm. A efectos de inspeccionar visualmente el proceso de encapsulación, se incorporó Nile Red en la fase

aceite antes de la emulsificación. Sin embargo, no se pudo observar fluorescencia en el interior de los microgeles para estos primeros ensayos (Fig. 5.8d).

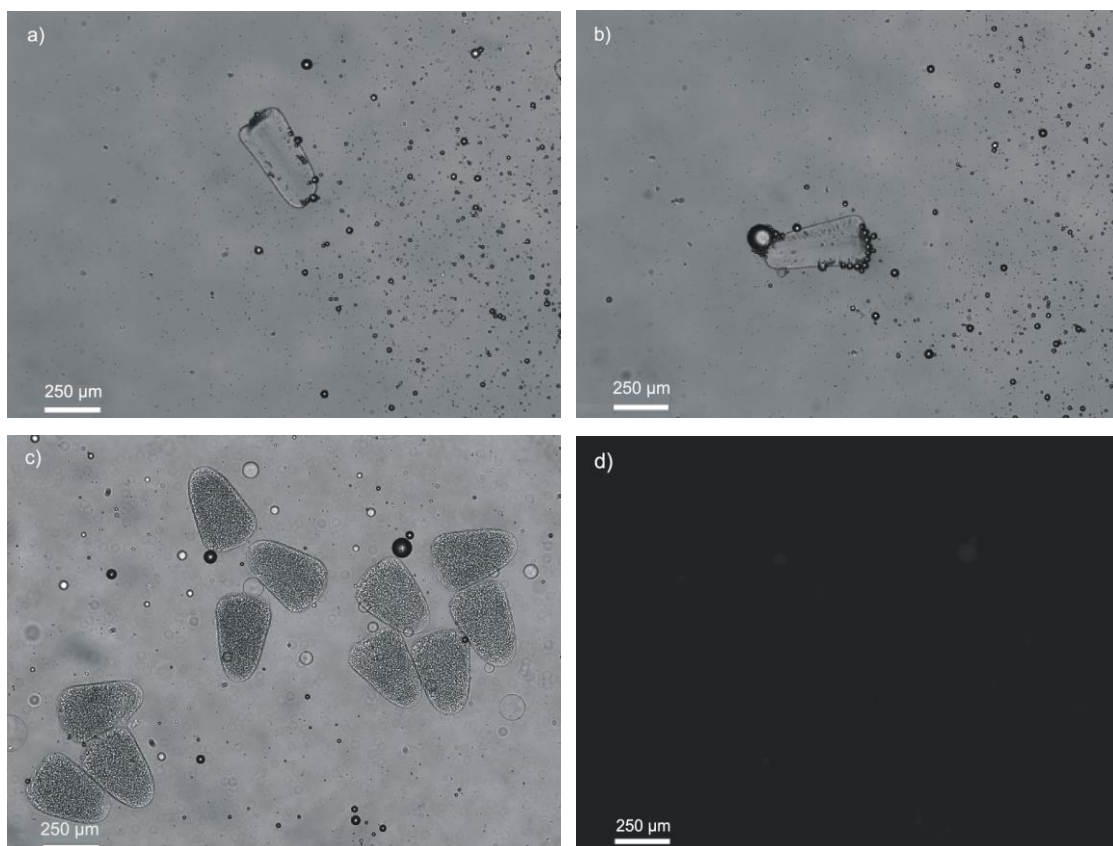


Figura 5.8: a) y b) Microgeles de pNIPAM sin la nanoemulsión interna; c) y d) Microgeles de pNIPAM que contienen gotitas de aceite: c) Imágenes ópticas; d) Imágenes de fluorescencia.

A partir de los resultados obtenidos, en primer lugar se planteó la hipótesis de fotoblanqueo debido a la irradiación UV, pero la misma se descartó mediante un experimento de control en el que la fase aceite que contenía Nile Red se irradió en condiciones similares. Posteriormente se planteó la hipótesis de que el colorante podría ser transportado desde la fase aceite interna O1 hacia la fase aceite externa O2 durante el proceso de preparación de los microgeles. Esto podría llevarse a cabo mediante la difusión mediada por micelas y/o por permeación a través de la película de agente tensoactivo de las nanogotas internas situadas en la superficie de la microgota acuosa (Pays y col., 2002). Para resolver este problema se limitó la cantidad en exceso de agente tensoactivo, disminuyendo su concentración en la emulsión primaria a 2 y 1% p/p. Se observó un incremento en la fluorescencia interna de los microgeles, lo que

confirmó la hipótesis planteada. Sin embargo, la fluorescencia fue muy baja. Por lo tanto, se reemplazó el agente tensoactivo de bajo peso molecular por uno de alto peso molecular, respetando los criterios de biocompatibilidad. La presencia de grandes moléculas en la interfaz de las gotas internas podría reducir la difusión del colorante, ya sea modificando la permeabilidad de la interfaz o disminuyendo el número de micelas que podrían transportar el colorante. A este efecto, se eligió al caseinato de sodio para reemplazar al Tween 80. Esta vez, las nanogotas de la emulsión fueron ligeramente más grandes (350 nm) y se mantuvieron estables con el tiempo. Luego de la polimerización del pNIPAM en las gotas acuosas, se obtuvieron microgeles fluorescentes (Fig. 5.9).

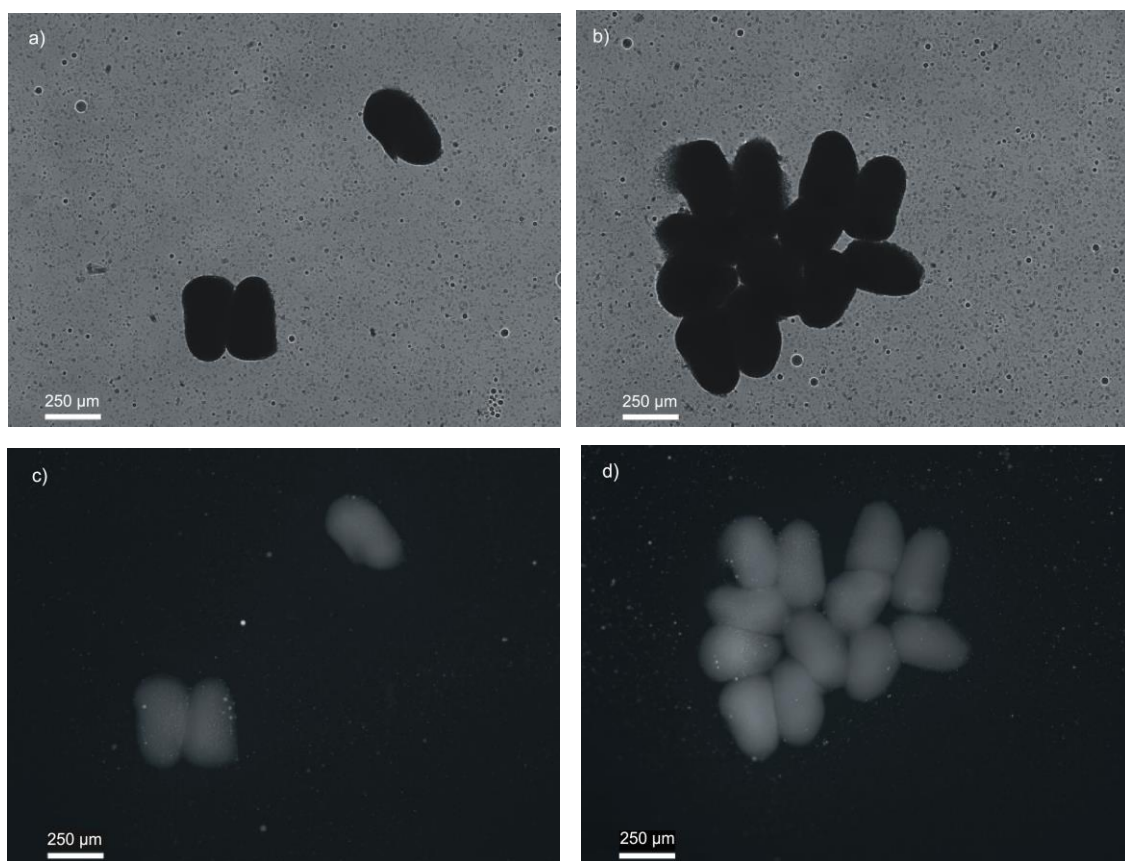


Figura 5.9: Microgeles de pNIPAM que contienen la emulsión preparada con 1% p p⁻¹ de caseinato de sodio: a) y b) Imágenes ópticas; c) y d) Imágenes de fluorescencia.

Esta estrategia optimizada se aplicó a los microgeles basados en AH-MA. Cuando la nanoemulsión se mezcló con la solución acuosa que contiene los macrómeros de AH-MA, incluso aumentando el contenido de grupos metacrilatos, se obtuvieron microgeles

compuestos pero el tamaño de las gotitas internas fue mayor que su tamaño inicial, lo cual significa que la estabilidad de la emulsión interna no fue mantenida (Fig. 5.10). Esto podría deberse a que la mayor viscosidad de la mezcla dificulta la polimerización, resultando en un mayor hinchamiento de los microgeles. La adición de un agente entrecruzante (BIS al 1% p/p) a la fase dispersa permitió la obtención de estructuras homogéneas, con fluorescencia distribuida de forma relativamente homogénea (Fig. 5.11). Las gotas internas no se resolvieron ópticamente, lo que indica que mantuvieron su tamaño inicial.

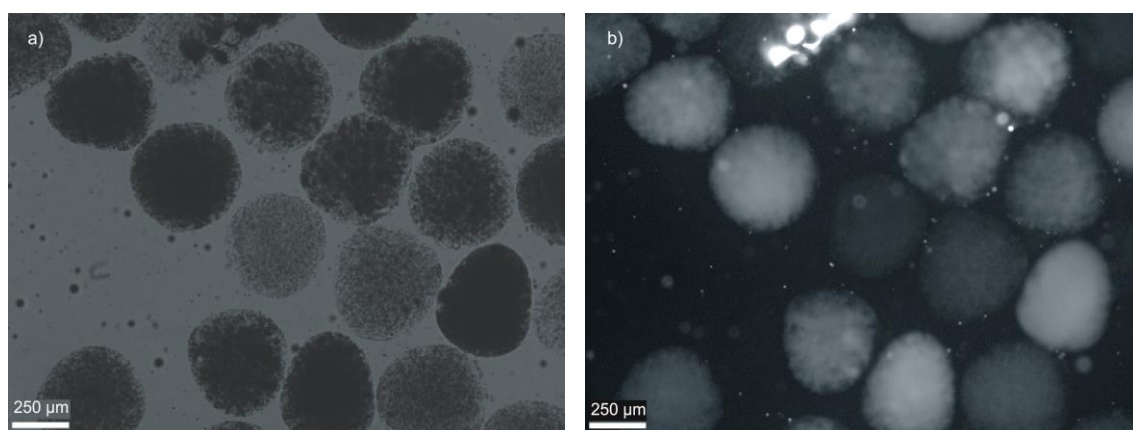


Figura 5.10: Microgeles de AH-MA preparados con AH-MA con un grado de metacrilación del 20% sin la adición de agente de entrecruzamiento y hexadecano conteniendo Nile Red como fase aceite: a) Imágenes ópticas; b) Imágenes de fluorescencia.

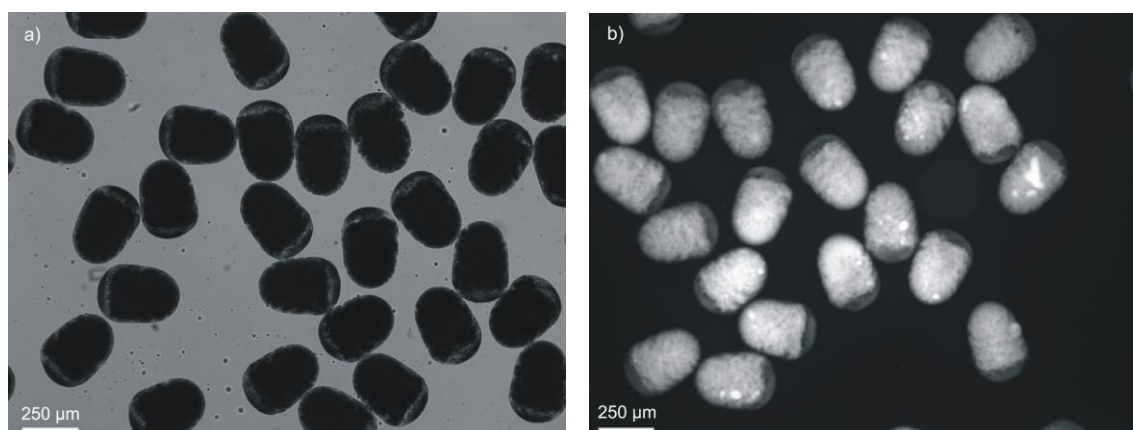


Figura 5.11: Microgeles de AH-MA preparados con BIS y hexadecano conteniendo Nile Red como fase aceite: a) Imágenes ópticas; b) Imágenes de fluorescencia.

5.3.c Estudios de degradación enzimática con hialuronidasas

La biodegradabilidad de los microgeles de AH-MA preparados con BIS como agente entrecruzante y Nile Red como compuesto encapsulado, se investigó por degradación enzimática con hialuronidasas (Fig. 5.12). Los microgeles se incubaron a 37 °C en buffer PBS (pH = 7,4) conteniendo 1% p/p de Tween 80, en presencia de 300 UI mL⁻¹ de hialuronidasas.

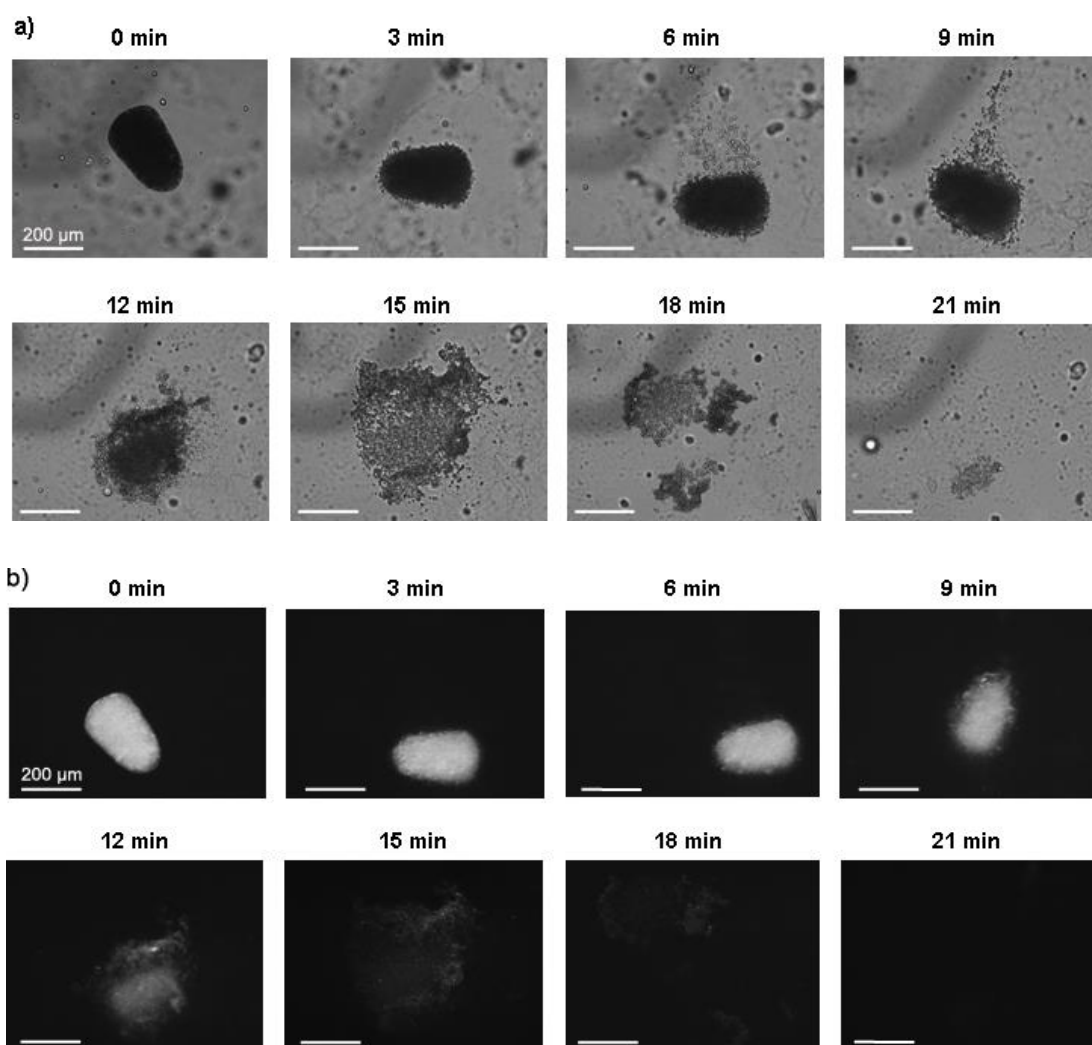


Figura 5.12: Degradación enzimática de un único microgel de AH-MA en el tiempo: a) Transmisión, b) Fluorescencia. La barra de escala es de 200 µm.

Como se muestra en la Fig. 5.12, la degradación enzimática de la matriz polimérica se produce en un período de 21 minutos aproximadamente. La forma del microgel se pierde progresivamente y simultáneamente aparecen pequeñas gotas en su superficie,

que difunden rápidamente. Se observa la aparición de una mayor cantidad de gotas en la superficie a medida que la forma del microgel se desvanece. Este escenario es muy similar a la disolución de las tabletas efervescentes de aspirina, excepto que las burbujas de gas son reemplazadas por pequeñas gotas de aceite.

5.3.d Aplicación de los microgeles a la encapsulación y liberación controlada de progesterona

Con el fin de utilizar compuestos biocompatibles para la encapsulación de la hormona, se sustituyó el hexadecano por aceite de girasol conteniendo la progesterona (0,06 M) durante la preparación de la emulsión primaria. El diámetro medio de las gotas de aceite de girasol en solución acuosa fue de 54 nm y el índice de polidispersidad fue cercano a 0,37 (Fig. 5.13). El tamaño de las gotitas de aceite y la polidispersidad permanecieron constantes a lo largo del tiempo.

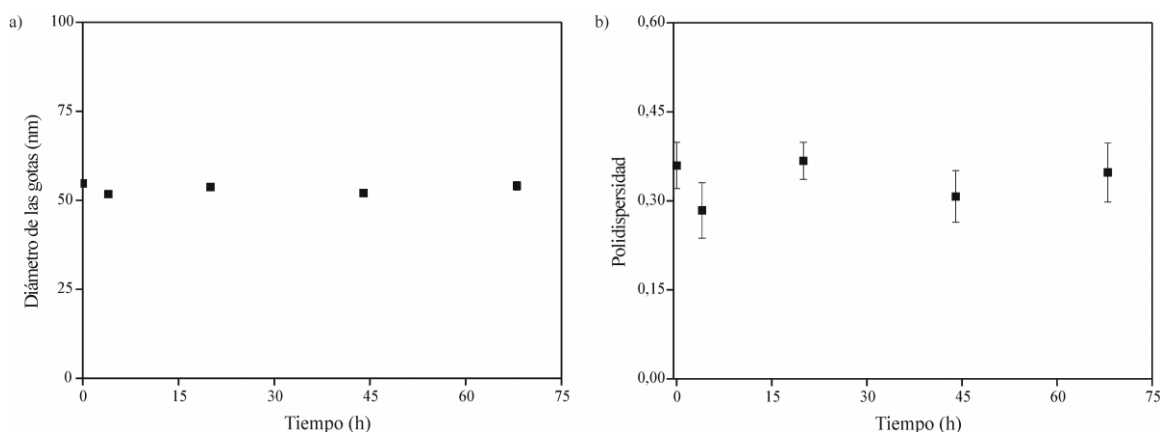


Figura 5.13: Características de la emulsión preparada con aceite de girasol conteniendo progesterona: a) Evolución del diámetro medio de gota; b) Evolución del índice de polidispersidad.

Las imágenes ópticas de los microgeles de AH-MA que contienen esta emulsión se muestran en la Fig. 5.14. La imagen sugiere que las gotitas individuales de aceite fueron encapsuladas, retenidas y distribuidas uniformemente dentro de la red de hidrogel de las partículas.

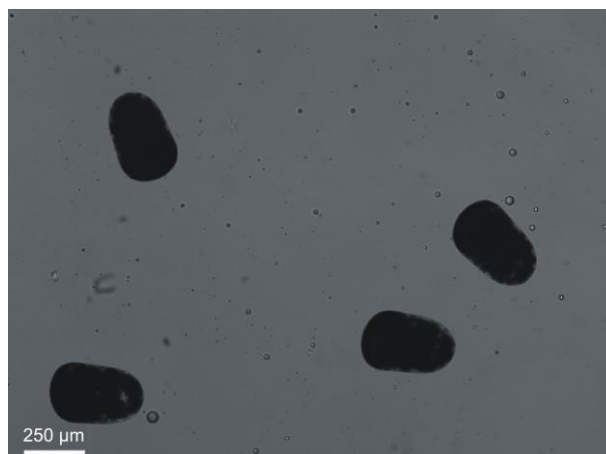


Figura 5.14: Imágenes de microscopía óptica de microgeles de AH-MA preparados con BIS y aceite de girasol contenido progesterona. La barra de escala es de 250 μm .

Se evaluó el potencial de estos microgeles para ser utilizados como sistemas de administración de fármacos. La Fig. 5.15 muestra imágenes tomadas en diferentes momentos durante el ensayo de liberación en presencia de diferentes concentraciones de hialuronidasas.

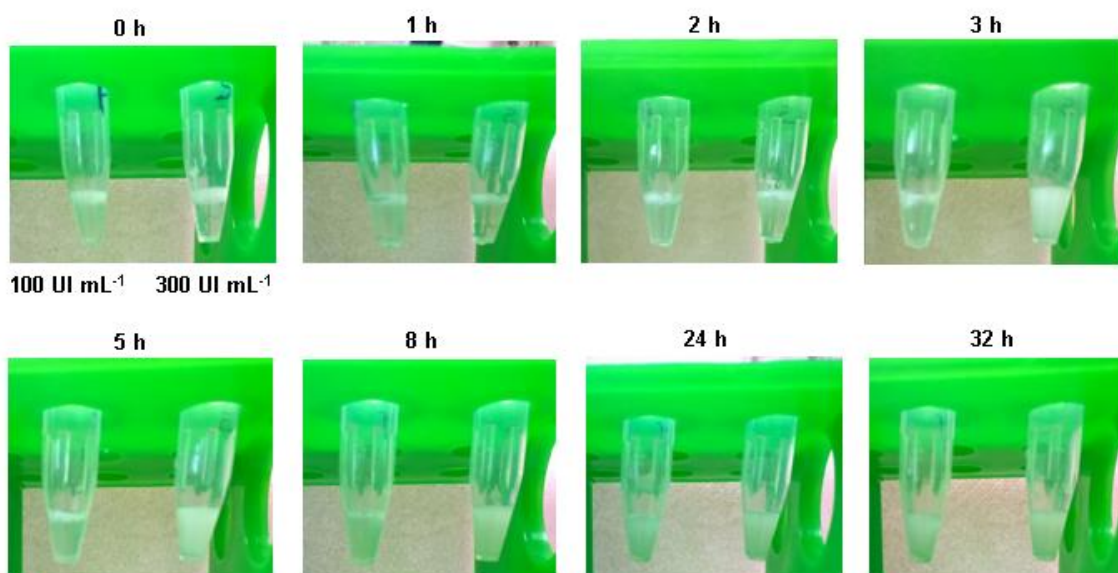


Figura 5.15: Fotografías del experimento de liberación de progesterona a partir de microgeles de AH-MA en presencia de hialuronidasas. Cada imagen presenta una solución con microgeles que contienen 100 UI mL⁻¹ de enzima (vial izquierdo) y 300 UI mL⁻¹ de enzima (vial derecho).

Los experimentos de liberación se realizaron en una colección de microgeles. Dado que las partículas poseen gotitas de aceite en su interior, su densidad es menor que la de

la fase acuosa y se encuentran flotando en la parte superior de la suspensión. Inicialmente el medio de liberación es claro, y a medida que tiene lugar la degradación de la matriz de AH se observa turbidez en el medio, indicando que las nanogotas de aceite invadieron esta parte de la solución. Debido a su tamaño pequeño, las gotas de aceite pueden difundir fácilmente en todo el volumen. Para los microgeles expuestos a una concentración de 300 UI mL^{-1} , el proceso de degradación empieza a ser macroscópicamente visible luego de 3 horas de ensayo, mientras que para microgeles expuestos a una concentración de 100 UI mL^{-1} , esta situación es visible después de 8 horas. Como era de esperar, no se observó la liberación de las nanogotas de aceite en la prueba control realizada en ausencia de enzima en el período estudiado.

La liberación de progesterona en respuesta a la degradación se analizó cuantitativamente por HPLC (Fig. 5.16). Los microgeles expuestos a una concentración de 300 UI mL^{-1} liberaron su carga en 1 día, mientras que los expuestos a una concentración de 100 UI mL^{-1} liberaron su carga en más de 2 días. En ambos casos, se observó una liberación de progesterona de aproximadamente 80%. Se realizaron análisis cuantitativos adicionales para evaluar la influencia del transporte del compuesto en la fase oleosa continua durante la preparación de microgeles. Se estimó que la pérdida de compuesto por transferencia hacia la fase continua fue de aproximadamente 6%, mientras que pueden producirse pérdidas adicionales durante las etapas de lavado y redispersión.

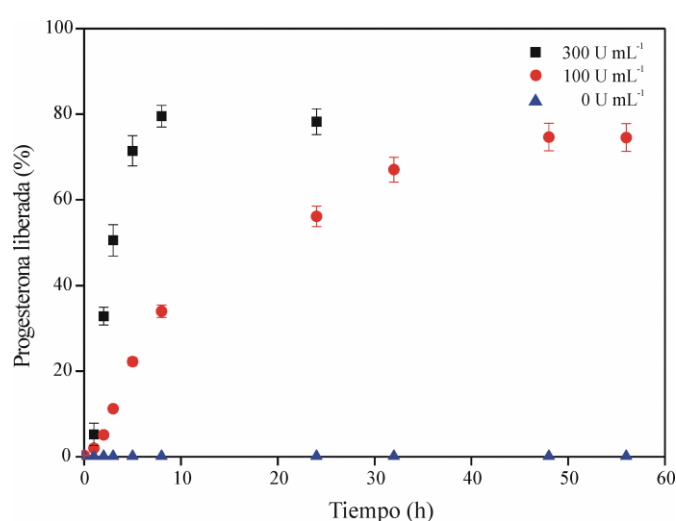


Figura 5.16: Efecto de la degradación enzimática sobre la liberación de progesterona a partir de los microgeles de AH-MA.

5.4 Conclusiones

La microfluídica proporciona una vía eficaz para la preparación de microgeles biodegradables de ácido hialurónico, que permiten la encapsulación y liberación de progesterona luego de la degradación enzimática. Aunque las micropartículas basadas en hidrogeles presentan gran interés como sistemas biocompatibles de administración de fármacos, su limitación a menudo reside en su escasa capacidad para encapsular fármacos hidrofóbicos. El método descrito permite la incorporación de una nanoemulsión de aceite conteniendo la droga en el interior de microgeles hidrofílicos, lo cual se logra mediante la formación de una doble emulsión aceite/agua/aceite, donde la fase acuosa se convierte posteriormente en la fase gel. La microfluídica ofrece un control preciso para la formación de una emulsión doble y permite la fotopolimerización en línea de los microgeles. Se empleó la degradación enzimática de los microgeles para provocar la liberación de las nanogotas de aceite cargadas con progesterona. En particular, se demostró que la enzima hialuronidasa, que está presente *in vivo*, puede provocar la liberación con una cinética dependiente de la concentración. Esta metodología es general y puede aplicarse a una amplia gama de fármacos hidrofóbicos. Dependiendo de la aplicación, la cinética de liberación requerida y la cantidad de fármaco liberado serán diferentes. Esos parámetros pueden ajustarse fácilmente a través de una elección apropiada del sitio de la inyección, ya que la cantidad de hialuronidasa varía en el cuerpo, pero también a través del control apropiado de la estructura del microgel. El procedimiento de síntesis puede optimizarse para producir partículas con características físico-químicas y estructurales preespecificadas (tamaño de microgeles y gotas, concentración de gotas, grado de entrecruzamiento de la matriz, composición química) para conseguir un perfil de liberación de fármaco deseado.

Capítulo 6

Micropartículas de quitosano entrecruzadas
con TPP para la liberación controlada de
progesterona

6.1 Introducción

6.1.a Quitosano

El quitosano es un polisacárido lineal obtenido por desacetilación química de la quitina, la cual es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza luego de la celulosa (Kumar y col., 2004). La quitina es el componente estructural del exoesqueleto de crustáceos e insectos, y de la pared celular de algunos hongos.

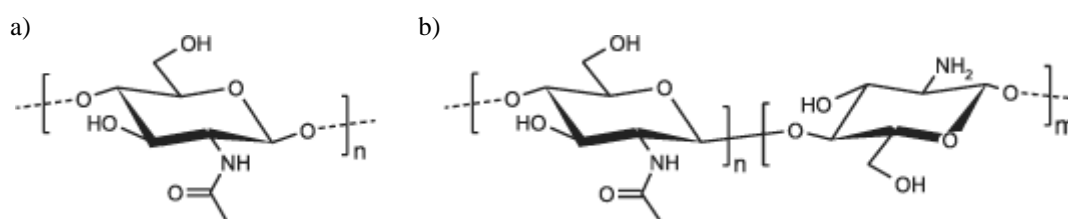


Figura 6.1: Estructura química de la quitina (a) y del quitosano (b).

El quitosano es un polisacárido compuesto de unidades de glucosamina y N-acetilglucosamina distribuidas al azar. La obtención de quitosano a partir de la quitina se realiza a través de un proceso de desacetilación parcial alcalina. La reacción de desacetilación involucra la pérdida del grupo acetilo del grupo amida del carbono 2, dando lugar a un grupo amino en esa posición. La desacetilación completa de la quitina produce un material totalmente soluble en medio ácido conocido como quitano; sin embargo, cuando la desacetilación es incompleta se crea una mezcla de cadenas que tienen distintas proporciones de unidades 2-acetoamida-2-deoxi- β -D-glucosa y 2-amida-2-deoxi- β -D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos β -1,4. La relación de estas unidades depende de las condiciones de reacción y genera materiales con distintas propiedades (Lárez Velásquez, 2003). La presencia de grupos amino permite la disolución del quitosano en soluciones acuosas de ácidos (ácido fórmico, acético, cítrico, láctico, clorhídrico, sulfúrico) por medio de la protonación de esos grupos. La carga positiva de los grupos amino aumenta la capacidad hidrofílica del quitosano. Debido a que el pKa del grupo amino en el quitosano es 6,5, el polímero se encuentra cargado positivamente en soluciones ácidas diluidas (actuando como un polication), por lo que podrá formar complejos electrostáticos con especies cargadas negativamente tales como proteínas, polielectrolitos aniónicos, aniones de bajo peso molecular y drogas (Neto y col., 2005; Kurita, 2006).

6.1.b Micropartículas de quitosano aplicadas a la liberación controlada de drogas

Debido a sus excelentes propiedades, tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad y bajo costo, el quitosano ha sido empleado en una variedad de aplicaciones biomédicas, incluyendo sistemas de liberación controlada de fármacos (Patel y Patel, 2014; Islam y col., 2012; Barakat and Almurshedi, 2011; Mitra y Dey, 2011; Guliyeva y col. 2006; Ko y col., 2002). Se han descrito varios métodos para la obtención de micropartículas de quitosano, tales como coacervación compleja, secado por atomización, gelificación iónica, entrecruzamiento químico y térmico, técnicas basadas en emulsión, entre otros (Tao y col., 2013; Aggarwal y Pahuja, 2013; Phromsopha y Baimark, 2010; Basu y col., 2010; Roy y col., 2009, Sinha y col. 2004). Entre los métodos mencionados para la preparación de micropartículas, el secado por atomización presenta diversas ventajas, tales como reproducibilidad, rapidez y fácil escalamiento (Liu y col., 2011). Mediante la selección de los parámetros de preparación apropiados es posible obtener micropartículas esféricas y con una distribución de tamaños estrecha (Esposito y col., 2000).

Se han preparado microesferas de quitosano entrecruzadas con el fin de controlar la velocidad de liberación de principios activos. Para este fin, se han empleado comúnmente diferentes agentes de entrecruzamiento químico, tales como glutaraldehído y formaldehído (Ofokansi y col., 2013; Thakkar y Murthy, 2008). Sin embargo, estos agentes de entrecruzamiento pueden inducir toxicidad y otros efectos indeseables debido a su naturaleza tóxica (Niknejad y Mahmoudzadeh, 2015; Kim y col., 2014). Como alternativa, es posible utilizar el entrecruzamiento físico por interacción electrostática (Cho y col., 2014; Walke y col., 2015; Desai y Park, 2005). El tripolifosfato (TPP) es un polianión no tóxico que puede interactuar con el quitosano mediante fuerzas electrostáticas entre las cargas negativas del agente entrecruzante y los grupos cargados positivamente del quitosano, para formar redes entrecruzadas iónicas (Stulzer y col., 2009; Barakat y Almurshedi, 2011; Shu y Zhu, 2001).

Hasta el momento, sólo se ha descrito una metodología para la preparación de micropartículas de quitosano para la liberación controlada de progesterona (Jameela y col., 1998). En este trabajo, los autores prepararon micropartículas mediante el método de emulsión agua/aceite utilizando glutaraldehído como agente entrecruzante, y se obtuvieron eficiencias de encapsulación de aproximadamente 35-40%. Los autores encontraron que la liberación de progesterona a pH 7,4 fue más lenta a medida que se

incrementaba el contenido de glutaraldehído. Además, observaron que la liberación fue más lenta a medida que aumentaba el tamaño de las micropartículas.

En este capítulo se investiga la preparación de micropartículas de quitosano para la encapsulación y liberación controlada de progesterona, utilizando TPP como agente entrecruzante. Las micropartículas se prepararon por el método de secado por atomización. Se estudió el efecto de las variables de formulación (concentración de agente entrecruzante, de quitosano y de surfactante, carga de droga) sobre las características finales de las partículas, tales como tamaño medio, morfología y eficiencia de encapsulación. Además, las micropartículas se caracterizaron mediante las siguientes técnicas: DSC para determinar el estado físico de la droga en el interior de la matriz polimérica, FT-IR para investigar la presencia de interacciones entre el quitosano y el agente entrecruzante, microscopía óptica y SEM para estudiar la morfología de las partículas y mediciones de potencial Z para determinar la carga de las partículas y la estabilidad de las suspensiones. Finalmente, se realizaron ensayos de liberación *in vitro* de progesterona a partir de las micropartículas de quitosano entrecruzadas y no entrecruzadas en diferentes medios de liberación. Los resultados obtenidos en este capítulo fueron enviados para su publicación en una revista científica internacional [Helbling, Busatto y col. (2017), “Preparation of TPP-crosslinked chitosan microparticles by spray drying for the controlled delivery of progesterone intended for estrus synchronization in cattle”, *Pharmaceutical Research*].

6.2 Trabajo experimental

6.2.1 Materiales

Quitosano [Eastar Holding Group (Dong Chen) Co. Ltd.], progesterona (99,2%, Farmabase), tripolifosfato de sodio (TPP, 85%, Sigma-Aldrich), polisorbato 80 (Tween 80, Anedra), ácido acético glacial (Cicarelli), hidróxido de sodio (NaOH, Cicarelli), ácido clorhídrico (HCl, Anedra), etanol absoluto (Cicarelli), acetato de sodio anhidro (Cicarelli), tetrahidrofurano grado HPLC (THF, Merck), metanol grado HPLC (Merck), hidrógenofosfato de sodio (Na_2HPO_4 , Anedra) y dihidrogenofosfato de potasio (KH_2PO_4 , Anedra). Todas las soluciones acuosas se prepararon con agua ultra pura.

6.2.2 Metodología

6.2.2.1 Determinación de la solubilidad de la progesterona en soluciones de quitosano

Se prepararon soluciones de quitosano (1-2% p/v) disolviendo el polímero en una solución de ácido acético al 1% v/v. Se añadió Tween 80 en diferentes concentraciones (0-10% p/v) y la solución se agitó durante 1 h. A continuación, se dispersó un exceso de progesterona en la solución y se sonicó durante 1 min. La dispersión resultante se mantuvo a temperatura ambiente bajo agitación magnética a 100 rpm durante 48 h. Posteriormente, las soluciones se filtraron con una membrana de microfiltración de 0,45 μm (Microclar[®], Argentina) para eliminar el exceso de hormona no disuelta y se añadió una gota de NaOH 5 M para precipitar el polímero. Luego de centrifugar a 2000 rpm durante 2 min, se descartó el precipitado y se midió la concentración de progesterona en el sobrenadante por la técnica de HPLC detallada en la sección 6.2.2.4h. El ensayo se realizó por triplicado.

6.2.2.2 Caracterización del quitosano

6.2.2.2.a Determinación del grado de desacetilación del quitosano

El grado de desacetilación (GD) del quitosano se determinó mediante una técnica de titulación conductimétrica. Brevemente, se disolvieron 0,2 g de quitosano en 40 mL de ácido clorhídrico (0,054 mol L^{-1}). Esta solución se tituló con una solución de hidróxido de sodio (0,165 mol L^{-1}) a 25 °C bajo agitación magnética, empleando un titulador

conductimétrico/potenciométrico automático AT-510 (Kem). La solución de hidróxido de sodio se añadió en alícuotas de 0,2 mL cada 20 s y se registró la conductancia de la solución. Los valores de conductividad en función del volumen añadido de NaOH se representaron gráficamente y se determinaron los puntos de equivalencia. El grado de desacetilación del quitosano se calculó usando la siguiente ecuación:

$$GD(\%) = \frac{161 [\text{NaOH}] (V_2 - V_1)}{m} \quad (6.1)$$

donde [NaOH] es la concentración de la solución de NaOH (mol L^{-1}), V_1 y V_2 representan el volumen de NaOH (mL) añadido durante la titulación para alcanzar los correspondientes puntos de equivalencia, 161 es la masa molar de la unidad repetitiva del quitosano ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N}$) y m es la masa de quitosano (mg). Las mediciones se realizaron por triplicado.

6.2.2.2.b Pesos moleculares

El peso molecular medio en peso (\overline{M}_w) del quitosano y de las micropartículas luego de su preparación se determinó por SEC. Se disolvió una masa conocida de muestra en ácido acético y se sonicó durante 5 h, luego la solución se diluyó con fase móvil y se filtró previamente a su inyección. Se utilizó una bomba binaria Waters 1525, un conjunto de 5 columnas Waters Ultrahydrogel (7,8 mm x 300 mm, tamaños de poro: 120, 250, 500, 1000 y 2000 Å) y un detector de índice de refracción Waters 2414. Se empleó buffer acético/acetato (50 mM, pH 4,5) como fase móvil con un caudal de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Todas las determinaciones se realizaron a 25°C . Para la calibración se utilizaron estándares de Pululanos (Shodex P-82, Showa Denko).

6.2.2.3 Preparación de las micropartículas de quitosano

Las micropartículas de quitosano se prepararon por el método de secado por atomización. En primer lugar, se preparó una solución de quitosano (1-2% p/v) disolviendo el polímero en una solución de ácido acético al 1% v/v. A continuación, se dispersó la progesterona (0-20% p/p) en la solución de quitosano. Se emplearon varias concentraciones de Tween 80 (0-1% p/v) con el objetivo de aumentar la solubilidad de la progesterona y la estabilidad de la dispersión. El sistema se agitó a diferentes velocidades (4000-8000 rpm) usando un homogeneizador Ultra-Turrax T25D (IKA, Alemania). Luego de la homogeneización, se añadieron diferentes cantidades de TPP

(0,0-0,5 g g⁻¹) gota a gota y se agitó durante 30 min a diferentes velocidades (4000-8000 rpm). Posteriormente, la dispersión se bombeó al secador por atomización ADL311 (Yamato, Japón) empleando una bomba peristáltica. Para la atomización se utilizó una boquilla estándar de 0,406 mm. Se evaluaron varias condiciones experimentales, tales como el caudal de la solución de polímero (1.5-5.8 mL min⁻¹) y el caudal de aire de secado (0.02-0.19 m³ min⁻¹). La presión de aire de atomización fue de 0,15 MPa. Las micropartículas secas se recogieron en un recipiente contenedor y se almacenaron a temperatura ambiente hasta futuros ensayos.

6.2.2.4 Caracterización de las micropartículas

6.2.2.4.a Morfología de las partículas

La morfología de las micropartículas se estudió mediante SEM. Las muestras se colocaron sobre un taco de aluminio y se recubrieron con oro bajo atmósfera de argón (SPI Supplies, 12157-AX) en condiciones suaves (dos pulverizaciones de 40 s cada una con una intensidad de 15 mA). La morfología de micropartículas se examinó utilizando un voltaje de aceleración de 20 kV en un microscopio JEOL JSM-35C (JEOL, Japón) equipado con el programa de adquisición de imágenes JEOL SemAfore.

6.2.2.4.b Determinación del tamaño de partícula

Las micropartículas se resuspendieron en alcohol isopropílico y se observaron en un microscopio óptico (DM 2500M, Leica, Alemania) con una cámara acoplada LEICA DFC 290 HD. El diámetro medio y el grado de esfericidad de las micropartículas se determinaron a partir de las micrografías usando un programa de procesamiento de imágenes. Se midieron aproximadamente 300 partículas para cada formulación. El grado de esfericidad se determinó mediante la relación de aspecto (RA), que puede calcularse mediante la siguiente expresión:

$$RA = \frac{d_{Feret, \min}}{d_{Feret, \max}} \quad (6.2)$$

donde $d_{Feret, \min}$ es el diámetro mínimo de Feret (la distancia más corta) y $d_{Feret, \max}$ es el diámetro máximo de Feret (la distancia más larga).

6.2.2.4.c Mediciones de potencial Z

Las micropartículas se resuspendieron en buffer acético/acetato 1 mM pH 4,0 y en buffer fosfato salino (PBS) 1 mM pH 7,4. El pH final de las soluciones se ajustó mediante la adición de gotas de solución de NaOH 0,5 M. El potencial Z se determinó en estas dos condiciones por dispersión de luz electroforética usando un Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Inglaterra). Las muestras se inyectaron en celdas capilares plegadas y se determinó el potencial Z midiendo la dirección y la velocidad del movimiento de micropartículas en un campo eléctrico definido. Las mediciones se realizaron por triplicado.

6.2.2.4.d Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Se utilizó la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) con el fin de investigar las interacciones entre el quitosano y el TPP. Aproximadamente 2 mg de muestra y 50 mg de KBr se secaron durante 24 h a 30-40 °C y 105 °C, respectivamente. Los sólidos se mezclaron con un mortero y la mezcla se compactó empleando una prensa hidráulica a una presión de 4-6 toneladas durante 3 min. Los discos obtenidos se acondicionaron en un desecador y los espectros FT-IR se registraron utilizando un espectrofotómetro IR (FTIR-8201PC, Shimadzu, Japón) en el intervalo de 400-4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} y 40 scans por espectro.

6.2.2.4.e Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los análisis térmicos de las muestras se realizaron utilizando un calorímetro diferencial de barrido (Mettler 821-E, Mettler-Toledo). Las muestras (3-5 mg) se sellaron herméticamente en recipientes de aluminio. Como material de referencia se utilizó un recipiente de aluminio vacío. Las muestras se analizaron a una velocidad de calentamiento de 10 °C min^{-1} , de 0 a 250 °C, bajo flujo de nitrógeno (20 mL min^{-1}).

6.2.2.4.f Eficiencia de encapsulación

Se dispersaron aproximadamente 5 mg de micropartículas en 25 mL de etanol y se agitaron a 50 rpm durante 24 h para extraer la hormona. A continuación, las muestras se centrifugaron a 2000 rpm durante 2 min, se descartó el precipitado y se midió la concentración de progesterona en el sobrenadante mediante la técnica de HPLC

detallada en la sección 6.2.2.4.h. El ensayo se realizó por triplicado. La eficiencia de encapsulación (EE) se calculó de la siguiente manera:

$$EE = 100 \frac{C_{\text{experimental}}}{C_{\text{teórica}}} \quad (6.3)$$

donde $C_{\text{experimental}}$ y $C_{\text{teórica}}$ son la carga experimental y teórica de progesterona en las micropartículas, respectivamente.

6.2.2.4.g Ensayos de liberación *in vitro*

Se realizó un estudio preliminar para determinar las condiciones óptimas de los ensayos de liberación *in vitro*. Aproximadamente 20 mg de micropartículas se dispersaron en 100 mL de buffer fosfato 1 mM pH 7,4 conteniendo Tween 80 al 1% p/v y se mantuvieron a 37 °C bajo agitación orbital a 50 rpm. Se incluyó Tween 80 en el medio de liberación para aumentar la solubilidad de la hormona, asegurando *sink conditions*. En diferentes momentos, se tomaron alícuotas de 5 mL y se reemplazaron con un volumen igual de medio de liberación nuevo para mantener un volumen constante. La concentración de progesterona en cada alícuota se midió por el método de HPLC detallado en la sección 6.2.2.4.h. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se evaluaron cuatro condiciones diferentes relacionadas con la dispersión inicial y el muestreo: (a) Las micropartículas se sonicaron a tiempo inicial y se centrifugaron antes del muestreo; (b) Las micropartículas se sonicaron a tiempo inicial y no se centrifugaron antes del muestreo; (c) Las micropartículas no fueron sonicadas ni centrifugadas; (d) Las micropartículas se introdujeron en una bolsa de diálisis.

Luego de seleccionar las condiciones óptimas de liberación, se evaluó el efecto del contenido de TPP en las partículas y el pH del medio sobre la velocidad de liberación *in vitro* de progesterona a partir de las micropartículas de quitosano. Se emplearon dos buffers diferentes: (a) buffer fosfato 1 mM pH 7,4 conteniendo 1% p/v de Tween 80, y (b) buffer acético/acetato 1 mM pH 4,0 conteniendo 1% p/v de Tween 80. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los datos se linearizaron tomando la raíz cuadrada del tiempo y las velocidades de liberación se calcularon a partir de la regresión lineal.

6.2.2.4.h Cuantificación de progesterona mediante HPLC

La concentración de progesterona en las muestras de liberación se analizó empleando un equipo de HPLC (Prominence LC20A, Shimadzu, Japón) equipado con una columna

ZORBAX® Eclipse XDB-C18 (tamaño de partícula de 5 μm , 250 x 4,6 mm) a una longitud de onda de 254 nm. La fase móvil consistió en una mezcla de metanol y agua ultra pura (95:5 v/v), y el caudal fue de 1,0 mL min⁻¹. La temperatura de la columna fue de 30 °C para todas las determinaciones. El tiempo de elución de la progesterona obtenido en estas condiciones fue de $3,7 \pm 0,2$ min.

6.2.2.5 Análisis teórico

Se desarrolló un modelo farmacocinético para predecir la concentración plasmática de progesterona en animales. El modelo emplea dos tipos de parámetros para predecir los niveles de progesterona en plasma. Estos parámetros se obtienen a partir de la cinética de liberación *in vitro* y de la cinética del metabolismo *in vivo* del fármaco.

La cinética de liberación *in vitro* se utilizó como una aproximación de la velocidad de administración *in vivo* dado que se presentan condiciones similares en ambas situaciones. En el cuerpo del animal, la hormona se consume continuamente manteniendo su concentración de tejido cercana a cero. De forma similar, la concentración de progesterona en el medio de liberación durante los ensayos *in vitro* es despreciable en comparación con su solubilidad debido al gran volumen de medio acuoso. Por lo tanto, existen gradientes de concentración similares en ambas situaciones. Dado que el gradiente de concentración es el factor principal que determina la velocidad de liberación, se supone que la velocidad de administración es similar en ambas situaciones y, por lo tanto, la cinética *in vitro* se puede utilizar como una aproximación de la administración *in vivo*. La cinética de liberación *in vitro* se modeló usando la hipótesis del frente de disolución-difusión. Este enfoque implica la formación de dos regiones dentro de las micropartículas cuando están expuestas a un entorno acuoso: una región donde las moléculas de progesterona disueltas y no disueltas están en equilibrio, y una segunda región donde solo se presentan las moléculas disueltas. La interfaz entre ambas regiones a menudo se denomina "frente móvil". Este frente avanza hacia el interior de las micropartículas con el tiempo. En la segunda región, la hormona difunde siguiendo la segunda ley de Fick hasta alcanzar la superficie de las micropartículas y posteriormente disolverse en el medio externo. Además, a medida que el frente se mueve hacia adentro, el fármaco se disuelve instantáneamente. Por lo tanto, se puede proponer el siguiente balance de masa:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{D}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C}{\partial r} \right) \quad S < r < R \quad (6.4)$$

donde C es la concentración de progesterona disuelta, D es el coeficiente de difusión efectivo de la progesterona, S es la posición del frente móvil de disolución-difusión y R es el radio de las micropartículas de quitosano. Se consideran *sink conditions* y volumen infinito del medio de liberación, que definen la condición de frontera en $r = R$. Por otro lado, dado que el frente separa la región donde está presente el fármaco no disuelto, la concentración debe ser igual a la concentración de saturación en $r = S$:

$$\begin{aligned} C &= 0 & r &= R \\ C &= C_s & r &= S \end{aligned} \quad (6.5)$$

donde C_s es la concentración de saturación del fármaco en el polímero. La posición del frente móvil está determinada en cada momento por el balance de masa a cada lado del frente:

$$(A - C_s) \frac{\partial S}{\partial t} = -D \left. \frac{\partial C}{\partial r} \right|_s \quad (6.6)$$

donde A es el contenido inicial de progesterona en las micropartículas. La Ec. 6.4 se resolvió utilizando un método de diferencias finitas de segundo orden para discretizar la coordenada espacial y el esquema de Crank-Nicolson para las derivadas temporales. Esta ecuación se combina con la Ec. 6.6 pero se resuelven secuencialmente en cada paso de tiempo para desacoplarlas. El sistema de ecuaciones se implementó en una rutina MatLab®. El tiempo de cálculo típico fue menos de 1 minuto por simulación. Finalmente, la fracción de fármaco liberado (L) se obtiene del perfil de concentración del fármaco mediante integración numérica:

$$L = 1 - \left[\left(\frac{S}{R} \right)^3 + \frac{3}{AR^3} \int_S^R C r^2 dr \right] \quad (6.7)$$

La cinética del metabolismo *in vivo* de la progesterona se puede modelar mediante la ecuación de Hill (Mariano y col., 2010):

$$\frac{dC_x}{dt} = - \frac{1}{V_x} \frac{V_m C_x^h}{(K^h + C_x^h)} \quad (6.8)$$

donde C_x es la concentración de progesterona en plasma, V_x es el volumen total de distribución de la hormona, V_m es la velocidad máxima de metabolización, K es una constante que incluye los factores de interacción, y h es el coeficiente de Hill. Se informó un metabolismo de la progesterona catalizado por enzimas, que involucra sitios cooperativos de unión al sustrato que producen una curva de saturación sigmoidal que es descrita por la ecuación de Hill (Mariano y col., 2010).

Finalmente, la concentración plasmática de progesterona en animales puede predecirse combinando ambos tipos de parámetros en una sola ecuación derivada de un balance de masa global:

$$\frac{dC_x}{dt} = \frac{M_0}{V_x} \frac{dL}{dt} - \frac{1}{V_x} \frac{V_m C_x^h}{(K^h + C_x^h)} \quad (6.9)$$

donde M_0 es la masa inicial de progesterona inyectada. La Ec. 6.9 se implementó en una rutina MatLab® y se resolvió utilizando la función MatLab® ode23. El tiempo de cálculo típico fue menos de 1 minuto por simulación.

6.3 Resultados y discusión

En primer lugar se caracterizó el quitosano mediante la determinación del grado de desacetilación y del peso molecular del polímero. Para determinar el grado de desacetilación se realizaron titulaciones conductimétricas de una solución de quitosano. En la Fig. 6.2 se muestra una curva de titulación, en la cual se pueden observar tres segmentos de rectas: el primer segmento (A-B) corresponde a la neutralización del HCl en exceso, el segundo segmento (B-C) corresponde a la neutralización de los grupos amonio del quitosano y el tercer segmento (C-D) al exceso de base. Los dos puntos de estequiometría se encuentran dados por la intersección de las tres rectas, y la diferencia de volumen añadido entre dichos puntos corresponde al volumen de base requerida para neutralizar los grupos amonio. El grado de desacetilación calculado fue de 92%.

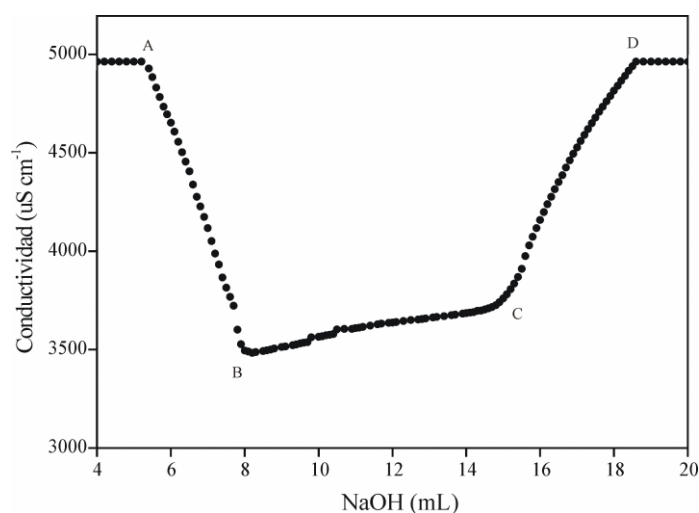


Figura 6.2: Curva de titulación conductimétrica del quitosano.

En la Fig. 6.3 se muestra la DPM del quitosano obtenida por SEC. Los valores calculados de peso molecular promedio en número y en peso fueron de 26385 y 63973 g mol⁻¹, respectivamente. El valor del índice de polidispersidad fue de 2,42. En la Fig. 6.3 se muestra además la distribución de pesos moleculares de las microesferas de quitosano luego de su preparación. Los valores calculados de peso molecular promedio en número y en peso fueron de 24116 y 61008 g mol⁻¹, respectivamente. El valor del índice de polidispersidad fue de 2,53. Al comparar ambas distribuciones, se puede observar un pequeño desplazamiento de la DPM de las microesferas de quitosano hacia menores valores de pesos moleculares respecto del quitosano original. A partir de este

resultado, se puede inferir que el proceso de síntesis de las microesferas no generó una degradación significativa del polímero.

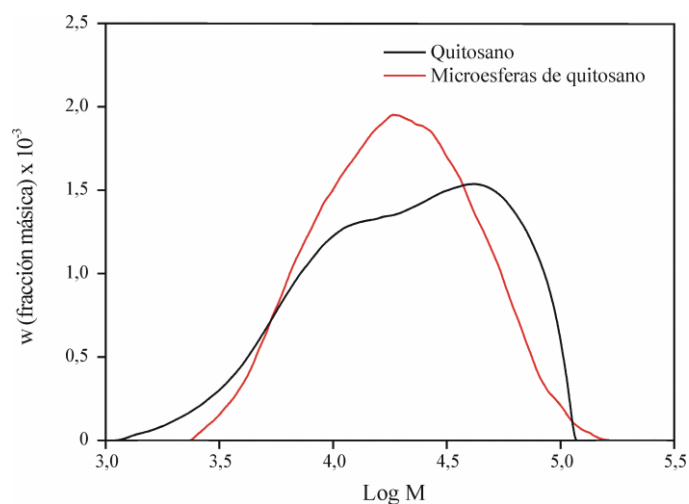


Figura 6.3: Distribuciones de pesos moleculares del quitosano y de las microesferas de quitosano.

El proceso de secado por atomización se ve afectado por diferentes variables operacionales, tales como la temperatura de entrada, el caudal de la solución de polímero y el caudal de aire de secado. En este sentido, se ensayaron diferentes caudales de la solución de polímero y del aire de secado para estudiar su efecto sobre el rendimiento de micropartículas.

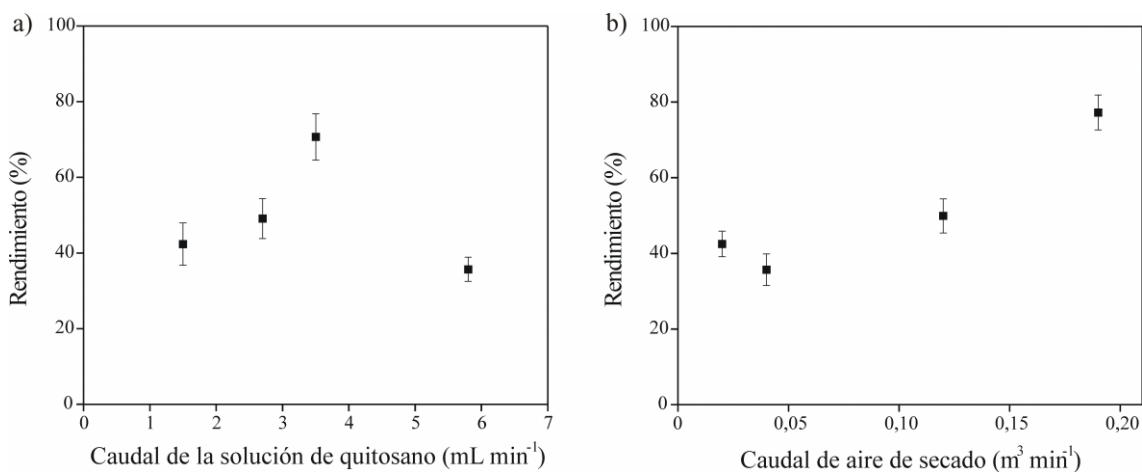


Figura 6.4: Efecto del caudal de la solución de polímero y del aire de secado sobre el rendimiento de micropartículas.

En la Fig. 6.4a se puede observar que el rendimiento de micropartículas aumenta a medida que se incrementa el caudal de la solución de quitosano hasta que se alcanza un máximo y luego disminuye. Si el caudal de la solución de polímero es demasiado alto en comparación con el caudal de aire, la solución no puede secarse completamente y el rendimiento disminuye debido a pérdidas de material húmedo que no es recolectado. Por otro lado, el rendimiento aumenta a medida que se incrementa el caudal de aire de secado (Fig. 6.4b), ya que permite secar una mayor cantidad de partículas. Por lo tanto, la condición de secado seleccionada para este sistema fue la siguiente: caudal de solución de quitosano de $3,4 \text{ mL min}^{-1}$ y caudal de aire de $0,19 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1}$. La temperatura de entrada fue de $170 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta condición permitió obtener un mayor rendimiento del proceso y micropartículas completamente secas.

Como la progesterona presenta una baja solubilidad en medio acuoso, se añadió Tween 80 a las formulaciones de quitosano para incrementar la solubilidad de la hormona. En la Fig. 6.5 se muestra el efecto de la concentración de agente surfactante sobre la solubilidad de la progesterona. En la solución de quitosano sin el agregado de Tween 80, la solubilidad de la hormona fue de $0,056 \pm 0,022 \text{ mg mL}^{-1}$. A medida que aumenta el contenido de agente surfactante (0,1-10,0% p/v), se observa un incremento en la solubilidad de la progesterona ($0,059 \pm 0,031 \text{ mg mL}^{-1}$ - $0,698 \pm 0,040 \text{ mg mL}^{-1}$). Sin embargo, una alta concentración de Tween 80 genera soluciones altamente viscosas que podrían afectar el proceso de secado. Debido a esto, se seleccionó una concentración de surfactante de 1% p/v en las formulaciones de quitosano para posteriores ensayos.

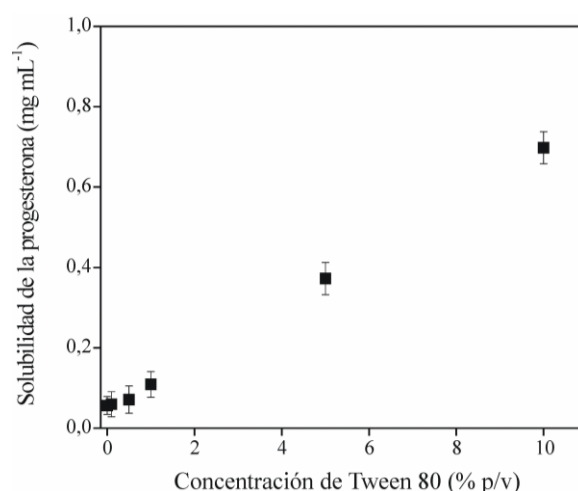


Figura 6.5: Efecto de la concentración de agente surfactante sobre la solubilidad de la progesterona en las formulaciones.

Se estudió el efecto de los factores de formulación sobre el tamaño de partícula. Para ello se evaluaron diferentes concentraciones de quitosano, Tween 80, TPP y progesterona. Los resultados se presentan en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Efecto de los factores de formulación sobre el tamaño de partícula y el grado de esfericidad.

Factor	Nivel	Carga de progesterona			
		0% p/p		20% p/p	
		D _p (μm)	RA	D _p (μm)	RA
Concentración de quitosano (% p/v)	1,00	3,66 ± 1,42	0,86 ± 0,09	3,13 ± 1,08	0,81 ± 0,04
	2,00	4,21 ± 1,93	0,84 ± 0,06	4,43 ± 1,37	0,82 ± 0,06
Concentración de Tween 80 (% p/V)	0,00	4,68 ± 1,90	0,72 ± 0,04	3,53 ± 1,36	0,73 ± 0,06
	0,10	4,59 ± 1,88	0,74 ± 0,08	3,21 ± 1,08	0,79 ± 0,04
	1,00	3,96 ± 1,34	0,81 ± 0,04	3,18 ± 1,32	0,85 ± 0,04
Contenido de TPP (g g ⁻¹)	0,00	3,66 ± 1,42	0,92 ± 0,11	2,96 ± 1,24	0,90 ± 0,08
	0,05	3,95 ± 1,78	0,89 ± 0,06	3,56 ± 1,01	0,84 ± 0,10
	0,10	4,59 ± 1,88	0,82 ± 0,05	3,21 ± 1,08	0,79 ± 0,06
	0,15	4,72 ± 1,71	0,75 ± 0,11	4,83 ± 1,98	0,75 ± 0,05
	0,30	4,63 ± 1,58	0,60 ± 0,09	3,74 ± 1,25	0,61 ± 0,05
	0,50	4,80 ± 1,97	0,54 ± 0,07	-	-

Para estudiar el efecto de la concentración de quitosano se prepararon micropartículas no entrecruzadas sin la adición de surfactante. El tamaño medio de partícula aumenta a medida que la concentración de quitosano se incrementa de 1 a 2% p/v, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (t-test, $p > 0,10$). La misma tendencia se observó para las partículas con progesterona. Para estudiar el efecto del agregado de Tween 80, se prepararon micropartículas empleando una solución de quitosano 1% p/v y 0,10 g g⁻¹ de TPP. El diámetro medio de las partículas disminuye a medida que la concentración de surfactante aumenta de 0 a 1% p/v, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (t-test, $p > 0,10$). La misma tendencia se observó para las partículas con progesterona. Finalmente, para estudiar el efecto de la concentración de TPP se prepararon micropartículas empleando una solución de quitosano 1% p/v y 0,10% p/v de Tween 80. No se detectó una tendencia

clara para el diámetro medio de partícula a medida que aumenta el contenido de TPP, tanto para las micropartículas que contienen la hormona como para las que no. Los resultados sugieren que los factores de formulación no tienen un efecto significativo sobre el diámetro de partícula bajo las condiciones estudiadas. El tamaño de partícula se encuentra determinado principalmente por la boquilla de atomización empleada.

Por otro lado, en la Tabla 6.1 se muestra además la relación de aspecto (RA) de cada formulación. Este parámetro oscila entre 0 y 1. Cuando es igual a 1, la partícula es completamente esférica. A medida que el valor se aleja de 1, el grado de esfericidad disminuye.

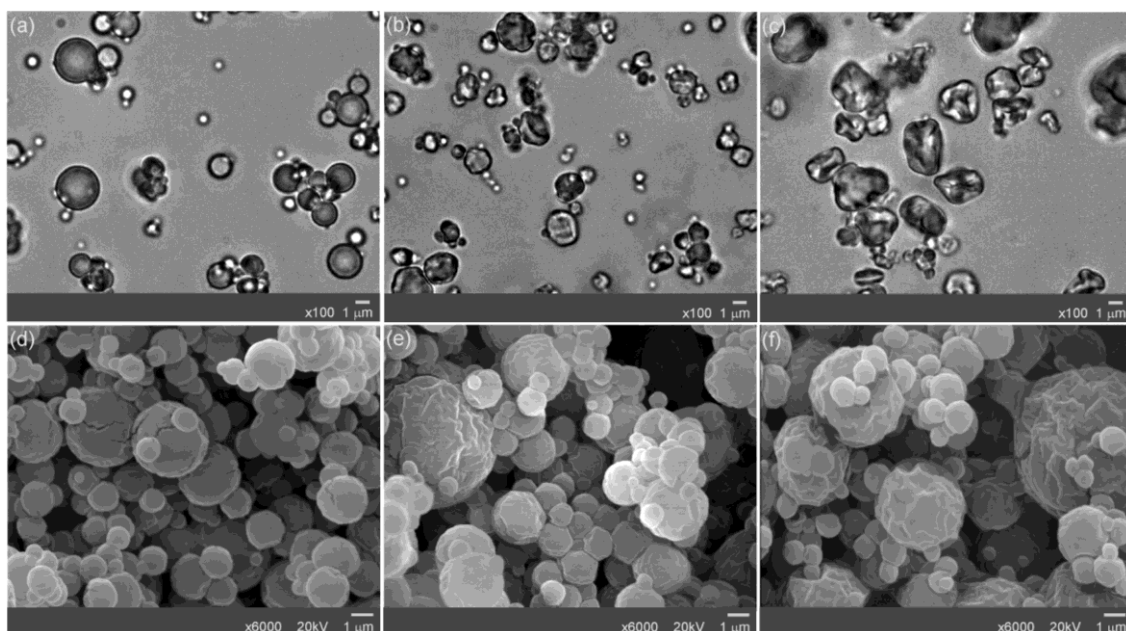


Figura 6.6: Efecto del contenido de TPP sobre la esfericidad y morfología de las micropartículas. Micrografías ópticas: (a) Micropartículas no entrecruzadas; (b) Micropartículas entrecruzadas con TPP (0,10 g g⁻¹); (c) Micropartículas entrecruzadas con TPP (0,30 g g⁻¹). Micrografías de SEM: (d) Micropartículas no entrecruzadas; (e) Micropartículas entrecruzadas con TPP (0,10 g g⁻¹); (f) Micropartículas entrecruzadas con TPP (0,30 g g⁻¹)

Los resultados sugieren que la concentración de quitosano y el contenido de progesterona no tienen un efecto significativo en la esfericidad (t-test, $p > 0,10$). Sin embargo, la RA aumenta a medida que la concentración de Tween 80 se incrementa de 0 a 1% p/v (t-test, valor $p < 0,10$), lo que significa que el surfactante tiene un efecto positivo sobre la esfericidad, posiblemente afectando la tensión superficial de las gotas. Este efecto también se observó para las partículas que contienen la hormona. Por el

contrario, la RA disminuye a medida que el contenido de TPP aumenta de 0 a 0,5 g g⁻¹ (t-test, $p < 0,10$), lo cual indica que la concentración de entrecruzanete tiene un efecto negativo sobre la esfericidad. Esto podría deberse a la formación de interacciones iónicas entre la TPP y el quitosano que confieren rigidez a la partícula durante el proceso de secado, lo cual afecta su morfología. Este efecto también se observó para las partículas que contienen la hormona. En la Fig. 6.6 se muestran las micrografías obtenidas por SEM y por microscopía óptica de las micropartículas de quitosano no entrecruzadas y entrecruzadas con TPP. Las micropartículas no entrecruzadas son esféricas y presentan una superficie lisa. A medida que aumenta el contenido de TPP las micropartículas se vuelven menos esféricas y presentan una superficie más rugosa.

El potencial Z es una medida de la carga superficial de las partículas en suspensión y se encuentra relacionada con la estabilidad coloidal. Normalmente, una suspensión de micropartículas con un potencial Z superior a 25 mV o inferior a -25 mV es muy estable. Por el contrario, las dispersiones con bajo potencial Z tienen más probabilidad de agregarse debido a las interacciones de Van Der Waals. En la Fig. 6.7 se presentan las mediciones de potencial Z de las micropartículas de quitosano en función del contenido de TPP. Las mediciones se realizaron empleando dos condiciones: a pH 4 para simular el entorno ácido del estómago y a pH 7,4 para simular las condiciones fisiológicas. En medio ácido, el potencial Z de las micropartículas no entrecruzadas fue de $73,00 \pm 1,29$ mV, indicando que las mismas poseen una carga neta positiva como resultado de la protonación de los grupos amino. A medida que el contenido de TPP aumenta de 0,05 g g⁻¹ a 0,30 g g⁻¹, el potencial Z disminuye de $65,60 \pm 2,29$ a $38,10 \pm 1,27$ mV, lo que sugiere una neutralización de los grupos amino cargados positivamente del quitosano con los grupos fosfatos cargados negativamente del TPP. A pH 7,4 las micropartículas de quitosano no entrecruzadas tienen un potencial Z de $-0,61 \pm 0,12$ mV. Este potencial cercano a cero sugiere que las micropartículas son neutras posiblemente porque los grupos amino no están protonados en esta condición. No se observó una tendencia clara en el potencial Z de las partículas cuando se incrementa el contenido de TPP a pH 7,4. Esto podría deberse a que las dispersiones de micropartículas se neutralizaron con NaOH para ajustar el pH del medio a 7,4 previamente a las determinaciones. En esta condición final, las partículas no tienen carga y la variación observada en los valores de potencial Z podría deberse al error experimental en la preparación de las muestras. Todos los valores de potencial Z a pH 4 son superiores a 25 mV, lo que sugiere que las dispersiones de micropartículas son muy

estables. Por el contrario, los valores más bajos a pH 7,4 indican mayor inestabilidad con posibilidad de agregación de partículas. Sin embargo, la agregación de partículas no fue observada debido posiblemente a la incorporación de Tween 80 en las formulaciones, el cual es un tensioactivo no iónico que permite estabilizar las dispersiones sin modificar la carga superficial de las partículas y, por tanto, su potencial Z.

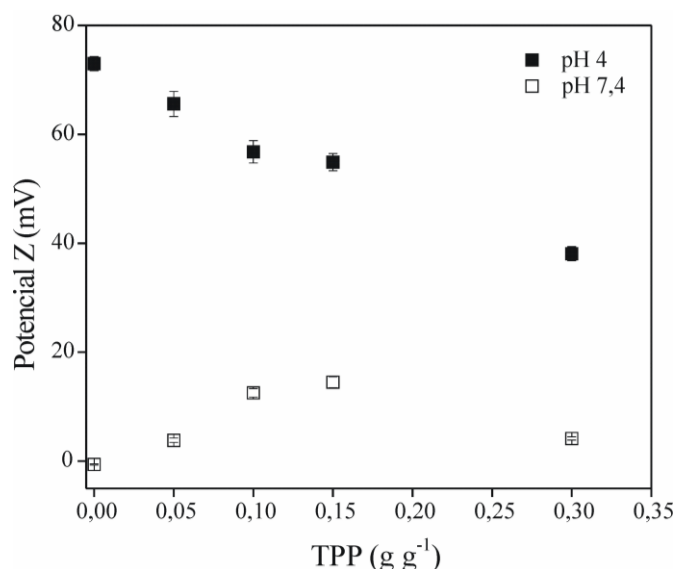


Figura 6.7: Mediciones de potencial Z de las micropartículas de quitosano con diferente contenido de TPP a pH 4 y 7,4.

En la Fig. 6.8 se presentan los espectros de FT-IR de las micropartículas con diferente contenido de TPP. Las micropartículas se lavaron con agua ultrapura antes del análisis para eliminar el posible exceso de TPP sin interactuar con el polímero. En las micropartículas de quitosano-TPP, se puede observar un ensanchamiento de la banda del grupo O-H a 3424 cm^{-1} , lo cual indicaría una mayor interacción por puentes de hidrógeno. Los resultados muestran que la señal correspondiente a 892 cm^{-1} , atribuida al estiramiento asimétrico P-O-P, aumenta en intensidad a medida que se incrementa el contenido de TPP. Esta señal indica la presencia de grupos fosfato en las partículas de CHT-TPP. Además, normalmente el grupo fosfato presenta una banda característica fuerte a $1050\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$. Sin embargo, esta banda puede haberse desplazado hacia una menor frecuencia de vibración por un efecto inductivo donante del nitrógeno de los grupos amino sobre el grupo fosfato. Por lo tanto, se puede inferir que las diferencias

observadas se deben principalmente a la interacción iónica entre las moléculas de CHT y TPP.

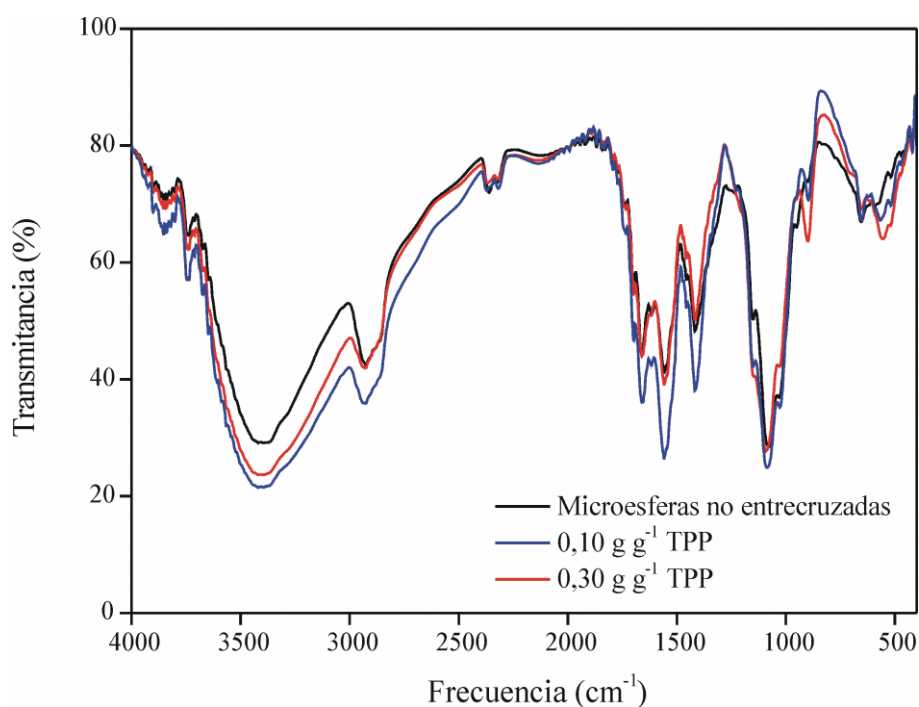


Figura 6.8: Espectros de FT-IR de las micropartículas de quitosano no entrecruzadas y entrecruzadas.

La Fig. 6.9 presenta el efecto del contenido de TPP sobre la eficiencia de la encapsulación de la progesterona. El porcentaje de hormona atrapada en las micropartículas no entrecruzadas fue de $74,97 \pm 4,75\%$. A medida que el contenido de TPP aumenta de 0,05 a $0,15 \text{ g g}^{-1}$, el rendimiento medio de la encapsulación disminuye de $70,32 \pm 4,63$ a $65,14 \pm 1,97\%$. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (t-test, $p > 0,10$). Con $0,30 \text{ g g}^{-1}$, el porcentaje encapsulado fue de $69,53 \pm 6,66\%$. Los resultados sugieren que el contenido de TPP no tiene un efecto significativo sobre la eficiencia de encapsulación de la progesterona.

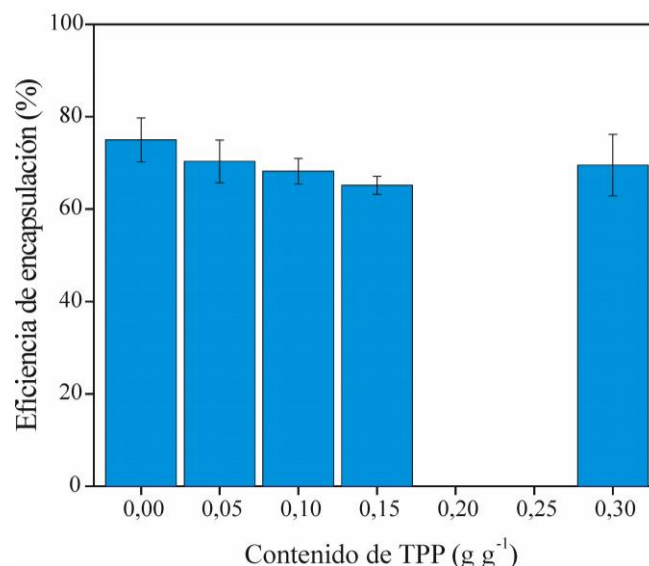


Figura 6.9: Efecto del contenido de TPP sobre la eficiencia de encapsulación de la progesterona.

En la Fig. 6.10 se presentan los resultados de los estudios de DSC. Se puede observar un pico endotérmico correspondiente a la fusión de los cristales de progesterona a los 130 °C aproximadamente. Se encuentra reportado que la progesterona puede existir en dos formas cristalinas (polimorfos): la forma α que es termodinámicamente más estable y tiene un punto de fusión de 129-131 °C y la forma β que tiene un punto de fusión de 121-123 °C (Kang y col., 2014; Rosilio y col., 1998). A partir de los resultados presentados en la Fig. 6.10 se puede concluir que los cristales de progesterona corresponden a la forma α . Las micropartículas no entrecruzadas y entrecruzadas con TPP muestran un pico endotérmico alrededor de los 127 °C, lo cual indica que los cristales de progesterona formados durante la preparación de las micropartículas también corresponden a la forma α . Se observó una ligera diferencia en la temperatura del pico de fusión correspondiente a la progesterona pura y a la progesterona encapsulada, debida posiblemente a interacciones de la droga con la matriz polimérica. Las micropartículas que no contienen progesterona no presentan ningún pico de fusión en este intervalo de temperaturas. A partir de los termogramas es posible observar que sólo una fracción de la hormona se encuentra en estado cristalino en el interior de las micropartículas, encontrándose predominantemente en estado amorfo. El pico presente a los 90-110 °C corresponde a la evaporación de las moléculas agua absorbidas en las micropartículas.

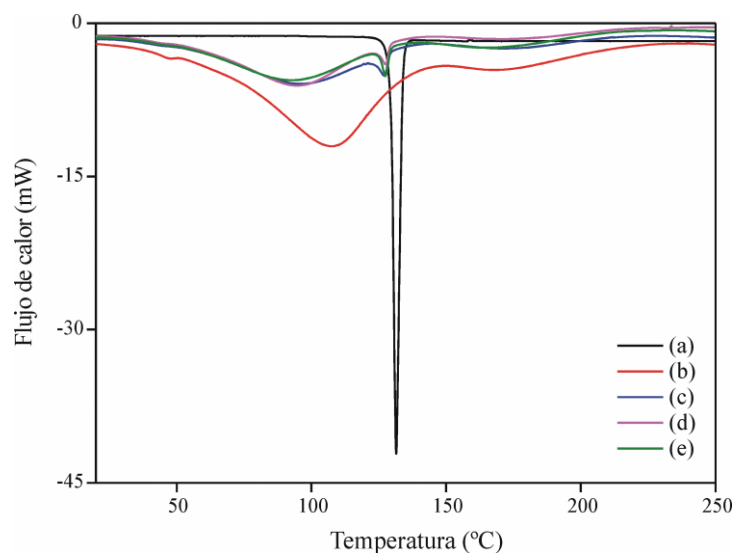


Figura 6.10: Termogramas de DSC de la progesterona y de las micropartículas de quitosano: (a) progesterona; (b) Microesferas no entrecruzadas sin progesterona; (c) Microesferas no entrecruzadas conteniendo progesterona; (d) Microesferas entrecruzadas con TPP ($0,10 \text{ g g}^{-1}$) conteniendo progesterona; (e) Microesferas entrecruzadas con TPP ($0,30 \text{ g g}^{-1}$) conteniendo progesterona.

Para determinar las condiciones experimentales de los ensayos de liberación *in vitro* se evaluaron diferentes métodos de dispersión y de muestreo. Los resultados se presentan en la Fig. 6.11.

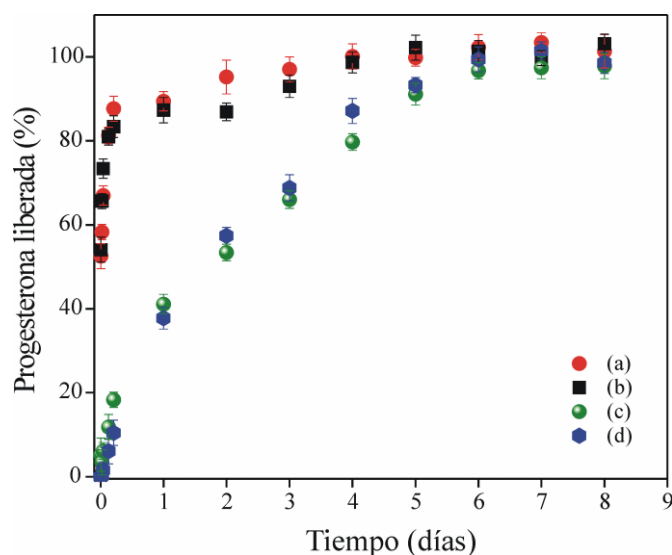


Figura 6.11: Perfiles de liberación *in vitro* de progesterona a partir de microesferas de quitosano entrecruzadas con TPP ($0,30 \text{ g g}^{-1}$) empleando diferentes condiciones de dispersión y muestreo. (a) Dispersión por sonicación y muestreo con centrifugación; (b) Dispersión por sonicación y muestreo sin centrifugación; (c) Dispersión sin sonicación y muestreo sin centrifugación; (d) Dispersión sin sonicación en bolsa de diálisis y muestreo sin centrifugación.

Al utilizar la sonicación para dispersar las micropartículas se observó una liberación inicial rápida de progesterona (alrededor del 80-85%), mientras que para las micropartículas no sonificadas este valor fue de aproximadamente 10-20%. La sonicación provoca fuertes vibraciones que alteran la aglomeración de las partículas pero al mismo tiempo aumentan la liberación de la droga acelerando su difusión hasta la superficie de las micropartículas. Por lo tanto, para los ensayos posteriores se empleó la dispersión sin sonicación. Por otro lado, una velocidad de agitación de 50 rpm fue suficiente para mantener las micropartículas bajo movimiento constante y suave durante los ensayos de liberación, permitiendo que las micropartículas estuvieran confinadas al tercio inferior del recipiente de liberación. Esta condición permitió tomar muestras del tercio superior, sin necesidad de centrifugar el sistema para separar las micropartículas del medio de liberación. Con el fin de comprobar la posible remoción de micropartículas durante el muestreo, se realizó un ensayo utilizando una bolsa de diálisis para confinar las micropartículas. El uso de la bolsa de diálisis asegura que no se retiren micropartículas del medio de liberación al realizar el muestreo. Los resultados mostraron una cinética de liberación similar tanto para los ensayos donde se utilizó bolsa de diálisis como en los ensayos realizados sin bolsa de diálisis. Este resultado sugiere que no se removieron micropartículas durante el muestreo en los ensayos realizados sin bolsas de diálisis. Por lo tanto, se adoptó el muestreo sin centrifugación para los ensayos posteriores.

Una vez establecidas las condiciones experimentales de liberación, se llevaron a cabo los ensayos de liberación *in vitro* de progesterona a partir de las micropartículas de quitosano entrecruzadas y no entrecruzadas en los diferentes medios. Los resultados se presentan en la Fig. 6.12.

La cinética de liberación presenta un perfil bifásico. Se puede observar una rápida liberación de la hormona (efecto “burst”) durante las primeras horas del ensayo, seguida por una fase de liberación lenta. Durante la fase de liberación “burst”, los fenómenos predominantes son la difusión y la disolución de la hormona localizada en la región superficial de las micropartículas y el hinchamiento de la matriz polimérica. En la segunda fase, el hinchamiento de la matriz alcanza un equilibrio y la liberación es controlada principalmente por la difusión de la hormona en la matriz polimérica. A pH 4, las micropartículas presentan cadenas poliméricas cargadas positivamente y la repulsión electrostática entre ellas genera matrices con un alto grado de hinchamiento y poros de gran tamaño. Por lo tanto, la hormona es liberada más rápidamente. A pH 7,4,

las micropartículas poseen cadenas poliméricas con cargas cercanas a la neutralidad, dando como resultado un menor hinchamiento de la matriz. Se observó una velocidad de liberación más lenta durante la fase “burst” a pH 7,4 en comparación con la observada a pH 4,0.

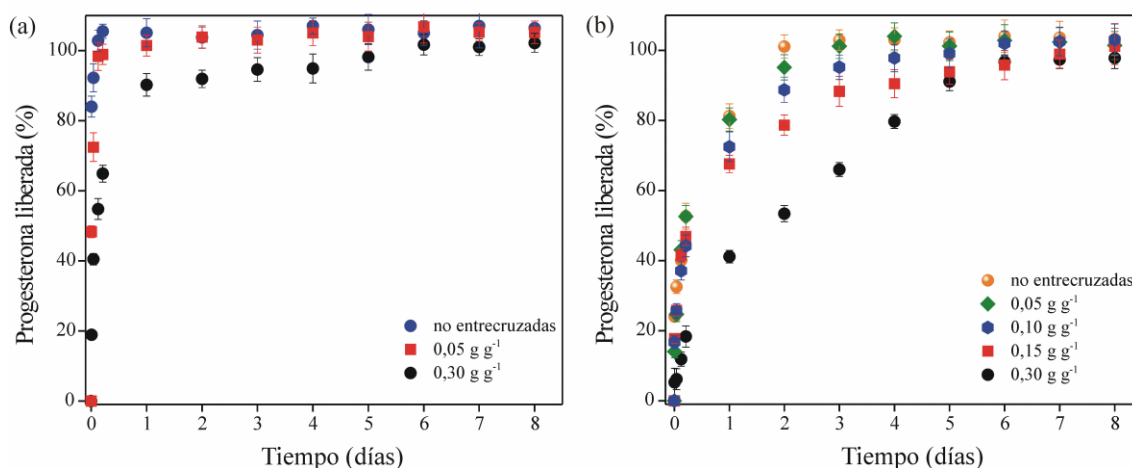


Figura 6.12: Perfiles de liberación *in vitro* de progesterona a partir de microesferas de quitosano en diferentes condiciones de pH. (a) pH 4,0; (b) pH 7,4.

A partir de la Fig. 6.12, se puede observar que las micropartículas no entrecruzadas presentaron el perfil de liberación más rápido en ambas condiciones de pH. La velocidad de liberación de progesterona desde las microesferas de quitosano-TPP depende del grado de entrecruzamiento de la matriz polimérica, el cual aumenta con el contenido de TPP. A medida que el contenido de TPP se incrementa de $0,05 \text{ g g}^{-1}$ a $0,30 \text{ g g}^{-1}$, la liberación de la hormona se llevó a cabo más lentamente. Esta tendencia se observó para ambos medios de liberación.

Se desarrolló un modelo matemático para predecir la concentración plasmática de progesterona en animales. El modelo requiere dos tipos de parámetros de entrada. El primer grupo se refiere a la formulación y comprende el diámetro de partícula (d), el contenido inicial de progesterona (A), la solubilidad de la hormona en la matriz polimérica (C_s), el coeficiente de difusión efectivo de la hormona en la matriz polimérica (D_p) y la cantidad de hormona inyectada en animales (M_{inj}). El segundo grupo se refiere al metabolismo de la progesterona en el cuerpo del animal que generalmente se explica por la ecuación de Hill y comprende todos sus parámetros farmacocinéticos. La información de la formulación se puede obtener directamente

durante la preparación, excepto por el coeficiente de difusión efectivo que se estima mediante métodos numéricos a partir de la cinética de liberación *in vitro*. La información sobre el metabolismo *in vivo* se obtiene de un estudio independiente donde la progesterona dispersada en solución salina estéril se administra por inyección en el cuerpo del animal y se mide la concentración plasmática a lo largo del tiempo. En este experimento se determinan los parámetros farmacocinéticos de la ecuación de Hill. Estos parámetros dependen de la especie animal y, por lo tanto, deben determinarse para cada tipo de animal utilizado.

Con el fin de validar el modelo matemático, se predijo la concentración plasmática de progesterona en conejos después de la administración de dos tipos de micropartículas entrecruzadas con glutaraldehído (GTA). Los resultados se presentan en la Fig. 6.13. Los experimentos *in vitro* e *in vivo* fueron reportados por Jameela y col. (1998) para micropartículas de quitosano-GTA y por Latha y col. (2000) para micropartículas de caseína-GTA. La información sobre las formulaciones se obtuvo directamente de estos trabajos, excepto por el coeficiente de difusión efectivo que se estimó a partir del ajuste de los perfiles de liberación *in vitro*, siendo $0,27 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ y $5,62 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para las micropartículas de quitosano-GTA y caseína-GTA, respectivamente. La Fig. 13a muestra los resultados de ajuste. El factor de diferencia (f_1) y el factor de similitud (f_2) se usaron para medir cuantitativamente el ajuste del modelo a los datos experimentales para cada formulación. El factor f_1 mide el porcentaje de error entre dos curvas en todos los puntos de tiempo, mientras que f_2 es una transformación logarítmica de la suma de cuadrados de los errores entre ambas curvas en todos los puntos de tiempo. El procedimiento para calcular estos factores se encuentra reportado en la literatura (Costa y col., 2001; Pillay y col., 1998, Moore y col., 1996). El factor f_1 es cero cuando los perfiles de prueba y de referencia son idénticos y aumenta proporcionalmente con la disparidad entre ellos. El f_2 es 100 cuando los perfiles de prueba y de referencia son idénticos y tiende a 0 a medida que aumenta la disimilitud. Por lo general, los perfiles con valores de f_1 inferiores a 15 (0-15) y valores de f_2 superiores a 50 (50-100) se pueden considerar iguales. Se obtuvieron los valores de $f_1 = 6,81$ y $f_2 = 63,92$ para las micropartículas de quitosano-GTA, y $f_1 = 1,77$ y $f_2 = 81,95$ para las de caseína-GTA. Además, la Fig. 6.13a presenta el ajuste del modelo obtenido para la liberación *in vitro* desde las micropartículas de quitosano entrecruzadas con TPP $0,30 \text{ g g}^{-1}$. El coeficiente de difusión efectivo fue $D_p = 0,95 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ y se obtuvieron valores de $f_1 = 6,08$ y $f_2 =$

67,97. A partir de estos resultados, se puede concluir que el modelo matemático presenta un muy buen acuerdo con los datos experimentales de liberación *in vitro*.

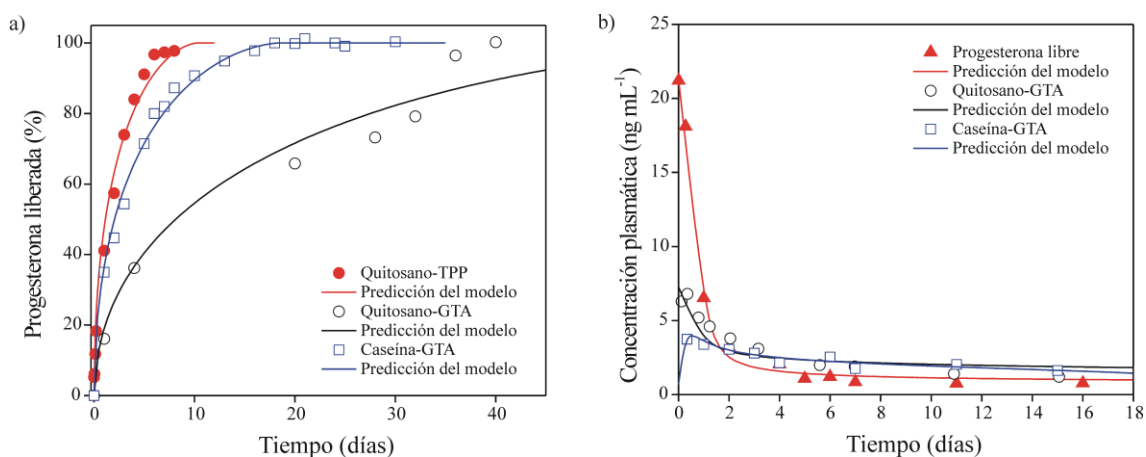


Figura 6.13: Resultados de simulación de modelo. a) Perfiles de liberación *in vitro* de progesterona a partir de microesferas de quitosano y caseína; b) Concentración plasmática de progesterona en conejos.

Los datos sobre el metabolismo de la progesterona en conejos se obtuvo de Jameela y col. En este trabajo, se inyectaron 10 mg de progesterona por vía intramuscular en los animales y se determinó la concentración plasmática durante varios días. A partir de estos datos se estimaron los parámetros farmacocinéticos de la ecuación de Hill mediante análisis de regresión no lineal, siendo $V_x = 397,73$ L, $V_m = 0,003$ mg min⁻¹ kg⁻¹, $K = 2,63$ ng mL⁻¹ kg⁻¹ y $h = 2,65$. Usando estos valores, se predijo la concentración plasmática después de la administración de progesterona dispersada obteniendo resultados excelentes como se puede observar en la Fig. 6.13b (progesterona libre, $f_1 = 5,40$, $f_2 = 98,65$). Usando los parámetros de formulación y metabolismo se predijeron las concentraciones plasmáticas en conejos después de la administración de las micropartículas de quitosano-GTA y caseína-GTA. El valor de M_{inj} fue de 10 mg para ambas formulaciones. Los resultados se presentan en la Fig. 6.13b. Se obtuvieron buenos resultados, siendo $f_1 = 7,50$ y $f_2 = 92,48$ para las micropartículas de quitosano-GTA, y $f_1 = 8,67$ y $f_2 = 98,21$ para las de caseína-GTA. Por lo tanto, se puede concluir que el modelo permite predecir con precisión los niveles *in vivo* de progesterona.

Una vez validado, el modelo se usó para predecir las concentraciones plasmáticas en el ganado luego de una administración teórica de las micropartículas de quitosano-TPP. Para todas las simulaciones, el valor de C_s fue de 0,109 mg cm⁻³ (determinado

experimentalmente) y D_p fue de $0,95 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (estimado previamente a partir de la cinética de liberación *in vitro*). Los parámetros farmacocinéticos de la ecuación de Hill se extrajeron de Mariano y col. (2010). En este trabajo, los autores evaluaron el metabolismo de la progesterona en bovinos después de la inyección de hormona dispersada obteniendo los siguientes valores: $V_x = 537 \text{ L}$, $V_m = 0,008 \text{ mg min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$, $K = 0,115 \text{ ng mL}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ y $h = 2,08$. Los otros parámetros del modelo se variaron arbitrariamente para estudiar sus efectos sobre los niveles plasmáticos: $d = 10\text{-}100 \text{ }\mu\text{m}$, $A = 0,06\text{-}0,15 \text{ g g}^{-1}$ y $M_{inj} = 50\text{-}250 \text{ mg}$. Los límites superiores de M_{inj} se adoptaron de acuerdo con lo informado en la literatura (Mariano y col., 2010; Turino, 2012). En estos trabajos, los autores analizaron el contenido residual de progesterona en dispositivos CIDR y la eficiencia de absorción en la circulación sistémica, concluyendo que 250 mg de hormona deberían ser suficientes para mantener los niveles plasmáticos dentro del rango terapéutico para la sincronización del ciclo estral. Los resultados de la simulación se presentan en la Fig. 6.14. Como se puede observar, la liberación es más lenta a medida que aumenta el tamaño de partícula, lo que permite mantener la concentración plasmática durante períodos más largos. Además, el aumento del contenido inicial también permite extender el tiempo de liberación. Finalmente, a medida que aumenta la masa de partículas administradas, los niveles en plasma también aumentan. Sin embargo, el tiempo de liberación es el mismo ya que las formulaciones tienen la misma composición. Por lo tanto, el tiempo de liberación puede ajustarse principalmente mediante el tamaño de partícula y el contenido inicial de droga, y la concentración plasmática puede controlarse modificando la cantidad de partículas administradas. Usando el modelo matemático, se pueden preparar formulaciones optimizadas para administrar progesterona de acuerdo con el tiempo y la dosis deseada.

Para la terapia de sincronización del estro, las micropartículas se deben dispersar en una solución acuosa estéril y se deben inyectar por vía transdérmica o intramuscular en los animales para liberar la progesterona de manera sostenida durante 5-8 días y luego la liberación debe finalizar rápidamente. Utilizando el modelo presentado en este trabajo, se puede encontrar una formulación óptima ajustando el tamaño de partícula, el contenido de progesterona y la cantidad inyectada para obtener una concentración plasmática superior a 2 ng mL^{-1} durante el tiempo requerido. El uso del modelo matemático permite reducir el tiempo, el esfuerzo y la cantidad de experiencias prácticas necesarias para desarrollar una formulación. Esto no solo representa un ahorro

económico, sino que también minimiza la experimentación con animales que se desea desde un punto de vista ético.

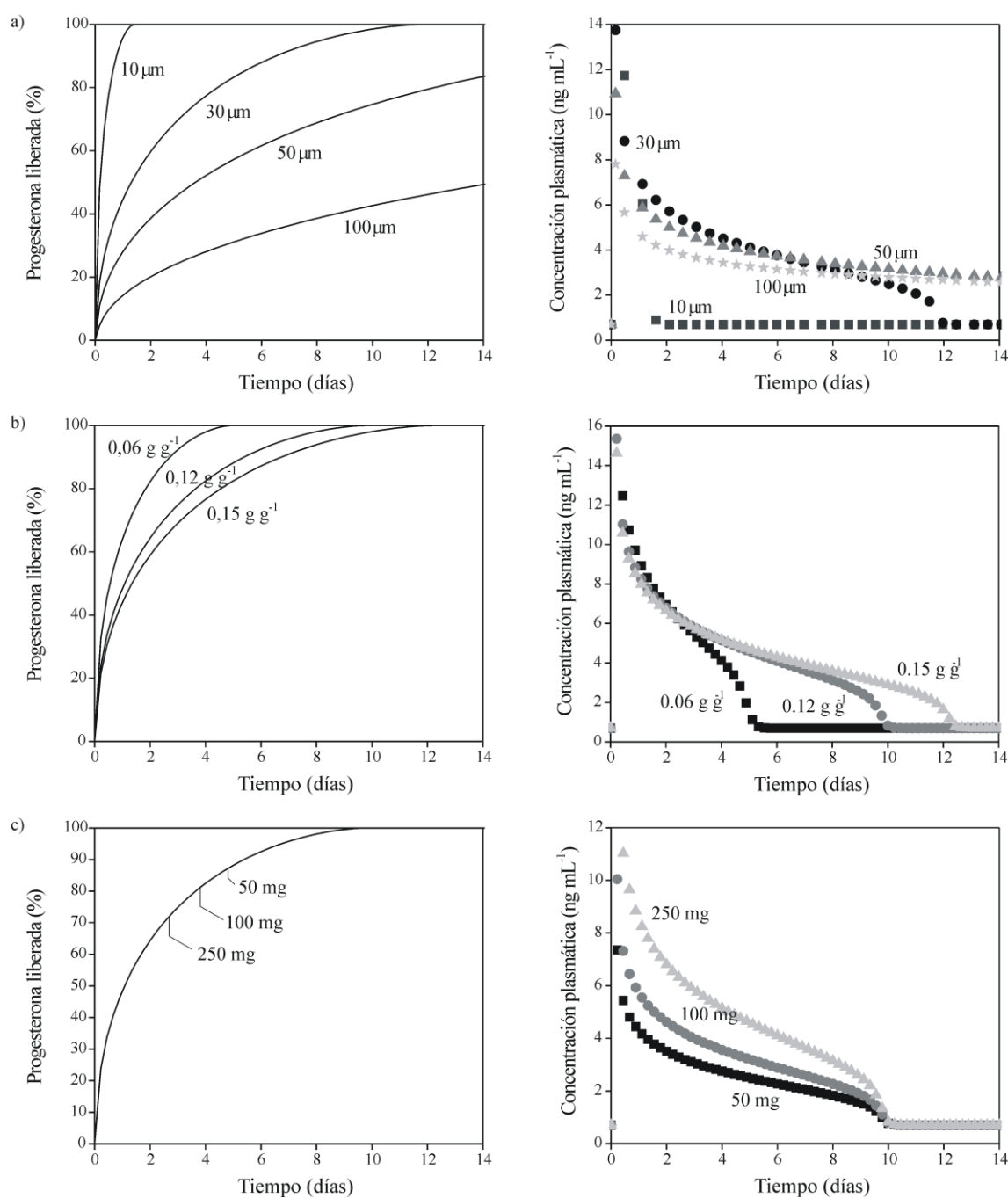


Figura 6.14: Predicciones teóricas del modelo sobre la liberación *in vitro* e *in vivo* de progesterona a partir de las micropartículas de quitosano-TPP. a) Efecto del tamaño de partícula; b) Efecto del contenido inicial de progesterona; c) Efecto de la cantidad de micropartículas inyectadas.

6.4 Conclusiones

En este capítulo se estudió la encapsulación y liberación controlada de progesterona a partir de micropartículas de quitosano entrecruzadas con TPP. Las micropartículas se obtuvieron por el método de secado por atomización. El tamaño medio de las partículas osciló entre 3 y 5 μm . El tamaño de las micropartículas no se vio afectado por los parámetros de formulación. Sin embargo, la esfericidad de las partículas aumentó con el contenido de Tween 80 y disminuyó con el contenido de TPP. El potencial Z de las micropartículas a pH 4 disminuyó con el grado de entrecruzamiento debido a la neutralización de los grupos amino y a pH 7,4 las partículas presentaron una carga cercana a la neutralidad. Se obtuvieron eficiencias de encapsulación de 69-75% aproximadamente, y los estudios de DSC demostraron que parte de la hormona se encuentra en estado cristalino en el interior de la matriz polimérica. El análisis FT-IR sugirió una interacción iónica entre los grupos amino cargados positivamente del quitosano y los grupos fosfato cargados negativamente del TPP. Los estudios de liberación *in vitro* demostraron que los perfiles de liberación presentan dos fases: “burst” y controlada por difusión, siendo la liberación de progesterona más rápida a pH bajo y en micropartículas no entrecruzadas. Este hecho ofrece la posibilidad de utilizar micropartículas de quitosano en terapias de liberación rápida y de liberación sostenida. Las velocidades de liberación pueden manipularse para conseguir niveles adecuados del principio activo de acuerdo con la terapia requerida. Para la progesterona, la liberación sostenida es la elección principal. Sin embargo, algunos principios activos requieren una liberación rápida para conseguir una alta concentración de droga en tiempos cortos, tales como los empleados en terapias oncogénicas.

Se desarrolló un modelo matemático para predecir la concentración plasmática de progesterona en animales. El modelo fue validado utilizando datos experimentales reportados por diferentes autores. Se obtuvo un muy buen acuerdo entre los datos simulados y los datos experimentales para los niveles de progesterona en conejos. El modelo también se usó para predecir niveles plasmáticos en bovinos después de una administración teórica de micropartículas de quitosano entrecruzadas con TPP. Los resultados mostraron que la extensión de la liberación depende principalmente del tamaño de partícula y del contenido inicial de la hormona, mientras que la cantidad inyectada afecta la concentración plasmática pero no altera el tiempo de liberación. El modelo se puede utilizar para optimizar formulaciones basadas en micropartículas con

el fin de obtener perfiles de liberación predeterminados y con mínima experimentación en animales.

Conclusiones finales y perspectivas futuras

Con el fin de mejorar la eficiencia reproductiva y, por tanto, la rentabilidad de un establecimiento agropecuario, los sistemas de liberación controlada de progesterona constituyen una herramienta prometedora para la sincronización del celo en el ganado bovino. Los protocolos de sincronización incluyen la administración de progesterona exógena durante 5-8 días de una manera controlada. Varios sistemas de liberación de progesterona están disponibles comercialmente, sin embargo, se encuentran basados principalmente en polímeros no biodegradables, usualmente siliconas. Esto genera cierta preocupación relacionada principalmente con la acumulación y deposición de dispositivos usados, y la manipulación excesiva de animales debido a la necesidad de remoción del dispositivo. Por lo tanto, resulta de especial interés el desarrollo de sistemas biodegradables de liberación controlada de progesterona. Para este fin, en el presente trabajo de tesis se evaluaron diferentes materiales poliméricos biodegradables para la obtención y caracterización de micropartículas por diferentes técnicas.

Las micropartículas de PLGA se han estudiado ampliamente como sistemas de liberación controlada de drogas, incluyendo la de progesterona. En el presente trabajo, se desarrolló un modelo matemático que permite predecir la degradación hidrolítica homogénea de microesferas de PLGA con un diámetro medio menor a 10 μm , en las cuales los fenómenos difusivos son despreciables. El modelo tiene en cuenta el efecto autocatalítico de los grupos carboxílicos y la composición del polímero sobre la velocidad de degradación del mismo y permite estimar las evoluciones de pesos moleculares medios, pérdida de masa, concentraciones de enlaces éster y el perfil de pH durante el proceso de degradación. El modelo permitió predecir adecuadamente el efecto de la composición del copolímero y el peso molecular sobre la velocidad de degradación de la matriz polimérica.

El modelo anterior fue extendido a fin de considerar la degradación hidrolítica heterogénea de microesferas de PLGA. En este sentido, se prepararon microesferas de PLGA con diferentes tamaños por el método de evaporación/extracción de solvente y se caracterizó su degradación en buffer PBS. El modelo se utilizó para estimar las evoluciones de pesos moleculares medios, distribuciones de pesos moleculares, pérdida de masa y cambios morfológicos de las micropartículas asociados al efecto autocatalítico durante la degradación. Además, el modelo se empleó para estudiar el efecto del tamaño de partícula y el peso molecular sobre la velocidad de degradación. Dicho modelo puede utilizarse para diseñar un sistema de liberación controlada de fármacos basado en micropartículas con un tiempo de degradación preespecificado.

El modelo de degradación heterogénea de microesferas de PLGA fue posteriormente extendido a fin de incorporar la disolución y el transporte de la droga intrapartícula. Para este propósito, se prepararon microesferas de diferentes tamaños por el método de evaporación/extracción de solvente y por microfluídica, y se estudió la liberación *in vitro* de progesterona. Los perfiles de liberación de la droga mostraron una dependencia con el tamaño de partícula. Las micropartículas con un tamaño inferior a 70 μm presentaron dos fases de liberación: *burst* y controlada por difusión, mientras que las partículas de mayor tamaño presentaron tres fases de liberación: *burst*, controlada por la difusión y controlada por la degradación de la matriz polimérica. A su vez, las micropartículas obtenidas por microfluídica presentaron una mayor reproducibilidad en los perfiles de liberación debido a la estrecha distribución de tamaños de las partículas. El modelo desarrollado permite relacionar la variación del coeficiente de difusión de la droga con la evolución de pesos moleculares de la matriz polimérica a fin de considerar los cambios morfológicos en las partículas durante la degradación. Los resultados de simulación mostraron una muy buena concordancia con los resultados experimentales.

Se estudió la síntesis de microgeles monodispersos de ácido hialurónico para la liberación controlada de progesterona. En particular, el método empleado permite encapsular nanogotas de aceite que contienen progesterona de manera controlada en el interior de partículas de microgeles hidrofílicos. La estrategia de síntesis se basa en la microfluídica, la cual ofrece un control preciso para la formación de una emulsión doble y permite la fotopolimerización en línea de los microgeles. Se caracterizó la degradación enzimática de los microgeles por hialuronidasas, que se encuentran presentes *in vivo*, y se demostró que puede ser utilizada para provocar la liberación de progesterona a partir de microgeles. Esta metodología puede aplicarse a una amplia gama de fármacos hidrofóbicos, tales como aquellos empleados en terapias oncológicas. El procedimiento de síntesis puede optimizarse para producir partículas con características físico-químicas y estructurales preespecificadas para conseguir un perfil de liberación de fármaco deseado.

Se investigó la preparación de microesferas de quitosano entrecruzadas con TPP para su aplicación a la encapsulación y liberación controlada de progesterona. Las micropartículas se obtuvieron mediante la técnica de secado por atomización. El tamaño de las partículas no se vio afectado por los parámetros de formulación, sin embargo, las mismas resultaron más esféricas al incrementar el contenido de surfactante y al disminuir el contenido de agente entrecruzante. El potencial Z de las micropartículas

disminuyó con el contenido de TPP y resultó ser menor pH neutro debido a la neutralización de los grupos amino del quitosano. Se obtuvieron eficiencias de encapsulación de 69-75% aproximadamente, y los estudios de DSC demostraron que la hormona se encuentra principalmente en estado amorfo en el interior de la matriz polimérica. El análisis FT-IR sugirió una interacción iónica entre los grupos amino cargados positivamente del quitosano y los grupos fosfato cargados negativamente del TPP. Los estudios de liberación *in vitro* mostraron que la liberación de la hormona fue más rápida a pH bajo y a partir de micropartículas no entrecruzadas. Por lo tanto, es posible modular la velocidad de liberación de un principio activo en función del grado de entrecruzamiento de las partículas y el pH del medio para su potencial aplicación en terapias de liberación rápida y de liberación sostenida. Además, se desarrolló un modelo matemático para predecir la concentración plasmática de progesterona en animales. El modelo fue validado utilizando datos experimentales reportados y se usó para predecir niveles plasmáticos en bovinos después de una administración teórica de micropartículas de quitosano entrecruzadas con TPP. El modelo se puede utilizar para optimizar formulaciones basadas en micropartículas con el fin de obtener perfiles de liberación predeterminados y con mínima experimentación en animales.

Como perspectivas futuras, se propone la realización de ensayos de degradación y de liberación de progesterona *in vivo* con los sistemas propuestos, con el fin de poder correlacionar los perfiles de degradación y liberación *in vitro* e *in vivo*.

Bibliografía

Aggarwal, S.; Pahuja, Sonia. Pharmaceutical relevance of crosslinked chitosan in microparticulate drug delivery. *International Research Journal of Pharmacy* 2013, 4, 45-51.

Albayrak, C. Induced phase transition method for the production of microparticles containing hydrophobic active agents. US 6899898, USA, 2005.

Alexis, F.; Venkatraman, S.; Rath, S. K.; Gan, L. H. Some insight into hydrolytic scission mechanisms in bioerodible polyesters. *Journal of Applied Polymer Science* 2006, 102, 3111–3117.

Alexis, F. Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly(lactic acid) and poly[(lactic acid)-co-(glycolic acid)]. *Polymer International* 2005, 54, 36–46.

Allison, S. Analysis of initial burst in PLGA microparticles. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2008, 5, 615–628.

Antheunis, H.; van der Meer, J. C.; de Geus, M.; Heise, A.; Koning, C. E. Autocatalytic equation describing the change in molecular weight during hydrolytic degradation of aliphatic polyesters. *Biomacromolecules* 2010, 11, 1118–1124.

Antheunis, H.; van der Meer, J. C.; de Geus, M.; Kingma, W.; Koning, C. E. Improved mathematical model for the hydrolytic degradation of aliphatic polyesters. *Macromolecules* 2009, 42, 2462-2471.

Arshady, Reza. Microspheres and microcapsules, a survey of manufacturing techniques part II: coacervation. *Polymer Engineering and Science* 1990, 30, 905-914.

Astete, C. E.; Sabliov, C. M. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2006, 3, 247–289.

At-Taras, E. E.; Spahr, S. L. Detection and characterization of estrus in dairy cattle with an electronic heatmount detector and an electronic activity tag. *Journal of Dairy Science* 2001, 84, 792-798.

Barakat, N. S.; Almurshedi, A. S. Preparation and characterization of chitosan microparticles for oral sustained delivery of gliclazide: in vitro/in vivo evaluation. *Drug Development Research* 2011, 72, 235–246.

Basu, S. K.; Kavitha, K.; Rupeshkumar, M. Evaluation of ketorolac tromethamine microspheres by chitosan/gelatin B complex coacervation. *Scientia Pharmaceutica* 2010, 78, 79-92.

Berchane, N. S.; Carson, K. H.; Rice-Ficht, A. C.; Andrews, M. J. Effect of mean diameter and polydispersity of PLG microspheres on drug release: Experiment and theory. *International Journal of Pharmaceutics* 2007, 337, 118-126.

Blanco, D.; Alonso, M. J. Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres: effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactants. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 1998, 45, 285-294.

Blanco, M.; Sastre, R.; Teijón, C.; Olmo, R.; Teijón, J. Degradation behaviour of microspheres prepared by spray-drying poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymers. *International Journal of Pharmaceutics* 2006, 326, 139–147.

Bodmeier, R.; Chen, H. Preparation of biodegradable poly(\pm)lactide microparticles using a spray-drying technique. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1998, 40, 754–757.

Bowey, K.; Neufeld, R. J. Systemic and mucosal delivery of drugs within polymeric microparticles produced by spray drying. *BioDrugs* 2010, 24, 359–377.

Brayden, D. J.; Oudot, E. J. M.; Baird, A. W. Drug delivery systems in domestic animal species. In: Cunningham F., Elliott J., Lees P., editors. *Comparative and Veterinary Pharmacology*. Springer GmbH 2010, 79–112.

Brodbeck, K. J.; Gaynor, G.; Duarte, A. T.; Tao-Ian, S. T. Gel composition and methods. US Patent 6130200, 2000.

Brunner, A.; Mäder, K.; Göpferich, A. pH and osmotic pressure inside biodegradable microspheres during erosion. *Pharmaceutical Research* 1999, 16, 847–853.

Bryant, S. J.; Nuttelman, C. R.; Anseth, K. S. Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2000, 11, 439–457.

Buchanan, F. Degradation rate of bioresorbable materials: prediction and evaluation. Woodhead, Cambridge, UK, 2008.

Bungenberg de Jong, H. G. Crystallisation–coacervation–flocculation. In: Kruyt, H. R.; editor. *Colloid science*. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1949, 232–258.

Burdick, J. A.; Chung, C.; Jia, X.; Randolph, M. A.; Langer, R. Controlled degradation and mechanical behavior of photopolymerized hyaluronic acid networks. *Biomacromolecules* 2005, 6, 386–391.

Cai, C.; Mao, S.; Germershaus, O.; Schaper, A.; Rytting, E.; Chen, D.; Kissel, T. Influence of morphology and drug distribution on the release process of FITC-dextran-loaded microspheres prepared with different types of PLGA. *Journal of Microencapsulation* 2009, 26, 334–345.

Casalini, T.; Rossi, F.; Lazzari, S.; Perale, G.; Masi, M. Mathematical modeling of PLGA microparticles: from polymer degradation to drug release. *Molecular Pharmaceutics* 2014, 11, 4036–4048.

Catalano, R.; Callejas, S. Detección de celos en bovinos. Factores que la afectan y métodos de ayuda. *Revista de Medicina Veterinaria* 2001, 82, 17–22.

Cavalieri, J.; Flinker, L. R.; Anderson, G. A.; Macmillan, K. L. Characteristics of oestrus measured using visual observation and radiotelemetry. *Animal Reproduction Science* 2003, 76, 1–12.

Chang, H. I.; Williamson, M. R.; Perrie, Y.; Coombes, A. G. A. Precipitation casting of drug-loaded microporous PCL matrices: incorporation of progesterone by co-dissolution. *Journal Controlled Release* 2005, 106, 263-272.

Chen, Y.; Zhou, S.; Li, Q. Mathematical modeling of degradation for bulk-erosive polymers: Applications in tissue engineering scaffolds and drug delivery systems. *Acta Biomaterialia* 2011, 7, 1140-1149.

Chen, W.; Palazzo, A.; Hennink, W. E.; Kok, R. J. Effect of particle size on drug loading and release kinetics of gefitinib-loaded PLGA microspheres. *Molecular Pharmacology* 2017, 14, 459-467.

Chiappetta, D.; Legaspi, M.; Niselman, V.; Pasquali, R.; Gergic, E.; Rodríguez Llimós, A. C.; Bregni, C. Biodegradable microspheres of poly(D,L-lactide) containing progesterone. *Ars Pharmaceutica* 2005, 45, 383-398.

Cho, A. R.; Chun, Y. G.; Kim, B. K.; Park, D. J. Preparation of chitosan-TPP microspheres as resveratrol carriers. *Journal of Food Science* 2014, 79, 568-576.

Christopher, G. F.; Anna, S. L. Microfluidic methods for generating continuous droplet streams. *Journal of Physics D: Applied Physics* 2007, 40, 319-336.

Colazo, M. G.; Kastelic, J. P.; Whittaker, P. R.; Gavaga, Q. A.; Wilde, R.; Mapletoft, R. J. Fertility in beef cattle given a new or previously used CIDR insert and estradiol, with or without progesterone. *Animal Reproduction Science* 2004, 81, 25-34.

Costa, P.; Sousa Lobo, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001, 13, 123-133.

De Jong, S. J.; Arias, E. R.; Rijkersb, D. T. S.; van Nostruma, C. F.; Kettenes-van den Bosch, J. J. and Henninka, W. E. New insights into the hydrolytic degradation of poly(lactic acid): Participation of the alcohol terminus". *Polymer* 2001, 42, 2795-2802.

Dendukuri, D.; Doyle, P. S. The synthesis and assembly of polymeric microparticles using microfluidics. *Advanced Materials* 2009, 21, 4071-4086.

Desai, K. G.; Park, H. J. Preparation of cross-linked chitosan microspheres by spray drying: effect of cross-linking agent on the properties of spray dried microspheres. *Journal of Microencapsulation* 2005, 22, 377-395.

Dewan, R.; Al-Mamun, E.; Jali, R. In vitro release kinetics of progesterone from biodegradable in situ implant system. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences* 2007, 6, 99-103.

Dinarvand, R.; Sepehri, N.; Manoochehri, S.; Rouhani, H.; Atyabi, F. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *International Journal of Nanomedicine* 2011, 6, 877-895.

Dobetti, L.; Pantaleo, V. Application of a hydrodynamic model to microencapsulation by coacervation. *Journal of Microencapsulation* 2002, 19, 139-151.

Dobrzynski, P.; Kasperczy, J.; Janeczek, H. and Bero, M. Synthesis of biodegradable copolymers with the use of low toxic zirconium compounds. 1. Copolymerization of glycolide with L-lactide initiated by $\text{Zr}(\text{Acac})_4$. *Macromolecules* 2001, 34, 5090-5098.

Duncanson, W. J.; Lin, T.; Abate, A. R.; Seiffert, S.; Shah, R. K.; Weitz, D.A. Microfluidic synthesis of advanced microparticles for encapsulation and controlled release. *Lab on a Chip* 2012, 12, 2135-2145.

Dunn, R. L.; English, J. P.; Cowsar, D. R.; Vanderbiit, D. D. Biodegradable in situ forming implants and methods for producing the same. US Patent 5340849, 1994.

Dunne, M.; Corrigan, O. I.; Ramtoola, Z. Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials* 2000, 21, 1659-1668.

Esposito, E.; Roncarati, R.; Cortesi, R.; Cervellati, F.; Nastruzzi, C. Production of Eudragit microparticles by spray-drying technique: influence of experimental parameters on morphological and dimensional characteristics. *Pharmaceutical Development and Technology* 2000, 5, 267-278.

Evans, T. Global animal health industry and trends, a US perspective, AVDA Congress: Thriving in Dynamic Times, St. Petersburg, FL, 2009.

Faisant, N. ; Siepmann, J. ; Benoit, J. P. PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2002, 15, 355-366.

Firk, R.; Stamer, E.; Junge, W.; Krieter, J. Automation of oestrus detection in dairy cows: A review. *Livestock Production Science* 2002, 75, 219-232.

Fisher, A. D.; Morton, R.; Dempsey, J. M. A.; Henshall, J. M.; Hill, J. R. Evaluation of a new approach for the estimation of the time of the LH surge in dairy cows using vaginal temperature and electrodeless conductivity measurements. *Theriogenology* 2008, 70, 1065-1074.

Fitzgerald, J. F.; Corrigan, O. I. Investigation of the mechanisms governing the release of levamisole from poly-lactide-co-glycolide delivery systems. *Journal of Controlled Release* 1996, 42, 125-132.

Ford Versypt, A. N.; Pack D. W.; Braatz, R. D. Mathematical modeling of drug delivery from autocatalytically degradable PLGA microspheres - a review. *Journal of Controlled Release* 2013, 165, 29-37.

Ford, A. N.; Pack, D.W.; Braatz, R. D. Multi-scale modeling of PLGA microparticle drug delivery systems. In: Pistikopoulos EN, Georgiadis M. C., Kokossis A. C., Editor(s), *Computer Aided Chemical Engineering*, Elsevier 2011, 29, 1475-1479.

Forde, N.; Beltman, M.; Lonergan, P.; Diskin, M.; Roche, J.; Crowe, M. Oestrus cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal Reproduction Science* 2011, 124, 163-169.

Fredenberg, S.; Wahlgren, M.; Reslow, M.; Axelsson, A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems - A review. *International Journal of Pharmaceutics* 2011, 415, 34-52.

Freiberg, S.; Zhu, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics* 2004, 282, 1-18.

Freitas, S.; Merkle, H. P.; Gander, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of Controlled Release* 2005, 102, 313-332.

Friend, J. R.; Yeo, L. Y.; Arifin, D. R.; Mechler, A. Evaporative self-assembly assisted synthesis of polymer nanoparticles by surface acoustic wave atomization. *Nanotechnology* 2008, 19, 145301.

Fu, K.; Pack, D. W.; Klibanov, A. M.; Langer, R. Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharmaceutical Research* 2000, 17, 100-106.

Fu, T.; Ma, Y.; Funfschilling, D.; Zhu, C.; Li, H. Z. Squeezing-to-dripping transition for bubble formation in a microfluidic T-junction. *Chemical Engineering Science* 2010, 65, 3739-3748.

Fu, X.; Ping, Q.; Gao, Y. Effects of formulation factors on encapsulation efficiency and release behaviour in vitro of huperzine A-PLGA microspheres. *Journal of Microencapsulation* 2005, 22, 705-714.

Galon, N. The use of pedometry for estrus detection in dairy cows in Israel. *Journal of Reproduction and Development* 2010, 56, 48-52.

Garner, J.; Skidmore, S.; Park, H.; Park, K.; Choi, S.; Wang, Y. A protocol for assay of poly(lactide-co-glycolide) in clinical products. *International Journal of Pharmaceutics* 2015, 495, 87-92.

Garstecki, P.; Gañán-Calvo, A. M.; Whitesides, G. M. Formation of bubbles and droplets in microfluidic systems. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences: Technical Sciences* 2005, 53, 361-372.

Gasper, M. M.; Blanco, D.; Cruz, M. E.; Alonso, M. J. Formulation of l-asparaginase-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of polymer properties on enzyme loading, activity and in vitro release. *Journal of Controlled Release* 1998, 52, 53-62.

Giunchedi, P.; Conte, U. Spray-drying as a preparation method of microparticulate drug delivery systems: an overview. *STP Pharma Sciences* 1995, 5, 276-290.

Grayson, A. C. R.; Cima, M. J.; Langer, R. Size and temperature effects on poly(lactic-co-glycolic acid) degradation and microreservoir device performance. *Biomaterials* 2005, 26, 2137-2145.

Grizzi, I.; Garreau H.; Li, S.; Vert, M. Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence. *Biomaterials* 1995, 16, 305-311.

Gu, H.; Duits, M. H. G.; Mugele, F. Droplets formation and merging in two-phase flow microfluidics. *International Journal of Molecular Sciences* 2011, 12, 2572–2597.

Guo, W.; Quan, P.; Fang, L.; Cun, D.; Yang, M. Sustained release donepezil loaded PLGA microspheres for injection: Preparation, in vitro and in vivo study. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015, 10, 405-414.

Hachet, E.; Van Den Berghe, H.; Bayma, E.; Block, M. R.; Auzély-Velty, R. Design of biomimetic cell-interactive substrates using hyaluronic acid hydrogels with tunable mechanical properties. *Biomacromolecules* 2012, 13, 1818-1827.

Hagberg, J.; Düker, A.; Karlsson, S. Determination of dissociation constants of low molecular weight organic acids by capillary zone electrophoresis and indirect UV detection. *Chromatographia* 2002, 56, 641-644.

Hakkarainen, M.; Albertsson, A. C.; Karlsson, S. Weight losses and molecular weight changes correlated with the evolution of hydroxyacids in simulated in vivo degradation of homo- and copolymers of PLA and PGA. *Polymer Degradation and Stability* 1996, 52, 283–291.

Han, F. Y.; Thurecht, K. J.; Whittaker, A. K.; Smith, M. T. Bioerodable PLGA-based microparticles for producing sustained-release drug formulations and strategies for improving drug loading. *Frontiers in Pharmacology* 2016, 7, 185.

Han, X. X.; Pan, J. Z. A model for simultaneous crystallisation and biodegradation of biodegradable polymers. *Biomaterials* 2009, 30, 423–430.

Han, X.; Pan, J. Polymer chain scission, oligomer production and diffusion - a two scale model for degradation of bioresorbable polyesters. *Acta Biomaterialia* 2011, 7, 538-547.

Hausberger, A. G.; Kenley, R. A.; DeLuca, P. P. Gamma irradiation effects on molecular weight and in vitro degradation of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Pharmaceutical Research* 1995, 12, 851-856.

Helmus, M. N.; Gibbons, D. F.; Cebon, D. Biocompatibility: meeting a key functional requirement of next-generation medical devices. *Toxicologic pathology* 2008, 36, 70-80.

Hernandez, C. J.; Mason, T. G. Colloidal alphabet soup: monodisperse dispersions of shape-designed particles. *Journal of Physical Chemistry C* 2007, 111, 4477-4480.

Hines, D. J.; Kaplan, D. L. Poly (lactic-co-glycolic acid) controlled release systems: experimental and modeling insights. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 2013, 30, 257-276.

Hurrell, S.; Cameron, R. E. Polyglycolide: degradation and drug release. Part I. Changes in morphology during degradation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2001, 12, 811–816.

Ilgin, P.; Avci, G.; Silan, C.; Ekici, S.; Aktas, N.; Ayyala, R. S.; John, V. T.; Sahiner, N. Colloidal drug carries from (sub) micron hyaluronic acid hydrogel particles

with tunable properties for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* 2010, 82, 997-1003.

Iqbal, M. M.; Middha, A. K. Effect of polymers on progesterone implants for estrus synchronization in livestock. *International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis* 2016, 5, 6-14.

Islam, M. A.; Firdous, J.; Choi, Y. J.; Yun, C. H.; Cho, C. S. Design and application of chitosan microspheres as oral and nasal vaccine carriers: an updated review. *International Journal of Nanomedicine* 2012, 7, 6077-6093.

Jain, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 2000, 21, 2475-2490.

Jameela, S. R.; Kumary, T. V.; Lal, A. V.; Jayakrishnan, A. Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system. *Journal Controlled Release* 1998, 52, 17-24.

Jana, S.; Gandhi, A.; Sen, K. K.; Basu, S. K. Natural polymers and their application in drug delivery and biomedical field. *Journal of PharmaSciTech* 2011, 1, 16-27.

Jia, X.; Yeo, Y.; Clifton, R. J.; Jiao, T.; Kohane, D. S.; Kobler, J. B.; Zeitels, S. M.; Langer, R. Hyaluronic acid-based microgels and microgel networks for vocal fold regeneration. *Biomacromolecules* 2006, 7, 3336-3344.

Johansen, P.; Merkle, H. P.; Gander, B. Technological considerations related to the up-scaling of protein microencapsulation by spray-drying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2000, 50, 413-417.

Kang, J.; Sah, E.; Sah, H. Applicability of non-halogenated methyl propionate to microencapsulation. *Journal of Microencapsulation* 2014, 31, 323-332.

Khan, F.; Tare, R. S.; Oreffo, R. O. C.; Bradley, M. Versatile biocompatible polymer hydrogels: Scaffolds for cell growth. *Angewandte Chemie - International Edition* 2009, 48, 978-982.

Khan, I. U.; Serra, C. A.; Anton, N.; Vandamme, T. Microfluidics: A focus on improved cancer targeted drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 2013, 172, 1065-1074.

Kim, J.; Hong, D.; Chung, Y.; Sah, H. Ammonolysis-induced solvent removal: a facile approach for solidifying emulsion droplets into PLGA microspheres. *Biomacromolecules* 2007, 8, 3900-3907.

Kim, M.; Takaoka, A.; Hoang, Q. V.; Trokel, S. L.; Paik, D. C. Pharmacologic alternatives to riboflavin photochemical corneal cross-linking: a comparison study of cell toxicity thresholds. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2014, 55, 3247-3257.

Kisaco Research. Why the animal health industry is your next big investment opportunity. *Animal Health Investment Europe Forum* 2016, London, UK.

Klose, D.; Siepmann, F.; Elkharraz, K.; Krenzlin, S.; Siepmann, J. How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 2006, 314, 198-206.

Ko, J. A.; Park, H. J.; Hwang, S. J.; Park, J. B.; Lee, J. S. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 2002, 249, 165–174.

Kreiser-Saunders, I. and Kricheldorf, H. R. Polylactones, 39. Zn lactate-catalyzed copolymerization of L-lactide with glycolide or ϵ -caprolactone. *Macromolecular Chemistry and Physics* 1998, 199, 1081-1087.

Kubo, K.; Nakamura, T.; Takagaki, K.; Yoshida, Y.; Endo, M. Depolymerization of hyaluronan by sonication. *Glycoconjugate Journal* 1993, 10, 435-439.

Kumar, P.; Dutta, J.; Tripathi, V. S. Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research* 2004, 63, 20-31.

Kurita, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology* 2006, 8, 203-226.

Kyle, B.; Kennedy, A.; Small, J. Measurement of vaginal temperature by radiotelemetry for the prediction of estrus in beef cows. *Theriogenology* 1998, 49, 1437-1449.

Lamb, G. C.; Smith, M. F.; Perry, G. A.; Atkins, J. A.; Risley, M. E.; Busch, D. C.; Patterson, D. J. Reproductive endocrinology and hormonal control of the estrous cycle. North Florida Research and Education Center, University of Florida, 2009.

Lane, A.; Wathes, D. An electronic nose to detect changes in perineal odors associated with estrus in the cow. *Journal of Dairy Science* 1998, 81, 2145-2150.

Lárez Velásquez, C. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polimeros* 2003, 4, 91-109.

Latha, M. S.; Lal, A. V.; Kumary, T. V.; Sreekumar, R.; Jayakrishnan, A. Progesterone release from glutaraldehyde cross-linked casein microspheres: in vitro studies and in vivo response in rabbits. *Contraception* 2000, 61, 329-334.

Laurent, T. C. Chemistry, biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives. In *Wenner-Gren International*, Laurent, T. C., Ed., 1998.

Leach, J. B.; Bivens, K. A.; Patrick, C. W.; Schmidt, C. E. Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering* 2003, 82, 578-589.

Lescure, F.; Gurny, R.; Doelker, E. In vitro and in vivo evaluation of progesterone implants based on new biodegradable poly (glutamic and glutamate esters) copolymers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 1995, 6, 797-807.

Li, S. M.; Garreau, H.; Vert, M. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly(α -hydroxyacids) in aqueous media. Part 1:

poly(DL-lactic acid). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1990, 1, 123-130.

Li, S.; McCarthy, S. Further investigations on the hydrolytic degradation of poly(DL-lactide). *Biomaterials* 1999, 20, 35-44.

Li, Y.; Rodrigues, J.; Tomas, H. Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications. *Chemical Society Reviews* 2012, 41, 2193–2221.

Li, Z. H.; Wu, J. M.; Zhao, Y. L.; Guan, J.; Huang, S. J.; Li, R. X.; Zhang, X. Z. Effect of the lactide/glycolide ratio and molecular weight of PLGA on the bovine BMPs microspheres systems. *Advanced Materials Research* 2012, 466-467, 405-410.

Liu, W.; Wu, W. D.; Selomulya, C.; Chen, X. D. Uniform chitosan microparticles prepared by a novel spray-drying technique. *International Journal of Chemical Engineering* 2011, 267218, 1-7.

Liu, Y.; Schwendeman, S. P. Mapping microclimate pH distribution inside protein-encapsulated PLGA microspheres using confocal laser scanning microscopy. *Molecular Pharmaceutics* 2012, 9, 1342–1350.

Lu, L.; Garcia, C. A.; Mikos, A. G. In vitro degradation of thin poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) films. *Journal of Biomedical Materials Research* 1999, 46, 236–244.

Lucy, M. C. Estrus: basic biology and improving estrous detection. *Dairy Cattle Reproductive Conference*, 2006, 29-37.

Lyu, S. P.; Schley, J.; Loy, B.; Lind, D.; Hobot, C.; Sparer, R.; Untereker, D. Kinetics and time-temperature equivalence of polymer degradation. *Biomacromolecules* 2007, 8, 2301-2310.

Mao, S.; Shi, Y.; Li, L.; Xu, J.; Schaper, A.; Kissel, T. Effects of process and formulation parameters on characteristics and internal morphology of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres formed by the solvent evaporation method. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2008, 68, 214-223.

Mariano, N. (2012). Nueva plataforma biodegradable para la administración sostenida de hormona para la sincronización del celo en bovino. Optimización de los patrones de liberación. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Mariano, R. N.; Turino, L. N.; Cabrera, M. I.; Scándolo, D. E.; Maciel, M. G.; Grau, R. J. A. A simple pharmacokinetic model linking plasma progesterone concentrations with the hormone released from bovine intravaginal inserts. *Research in Veterinary Science* 2010, 89, 250-256.

Masters, K. *Spray Drying Handbook*. 5th ed. John Wiley & Sons, New York, 1991.

Matschke, C.; Isele, U.; Van Hoogevest, P.; Fahr, A. Sustained-release injectables formed in situ and their potential use for veterinary products. *Journal of Controlled Release* 2002, 85, 1-15.

Medlicott, N. J.; Waldronb, N. A.; Fosterb, T. P. Sustained release veterinary parenteral products. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004, 56, 1345-1365.

Mehta, R. C.; Thanoo, B. C. and Deluca, P. P. Peptide containing microspheres from low molecular weight and hydrophilic poly(D,L-lactide-co-glycolide). *Journal of Controlled Release* 1996, 41, 249-257.

Meng, F. T.; Ma, G. H.; Qiu, W.; Su, Z. G. W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles. *Journal of Controlled Release* 2003, 91, 407-416.

Messenger, L.; Portecop, N.; Hachet, E.; Lapeyre, V.; Pignot-Paintrand, I.; Catargi, B.; Auzély-Velty, R.; Ravaine, V. Photochemical crosslinking of hyaluronic acid confined in nanoemulsions: Towards nanogels with a controlled structure. *Journal of Materials Chemistry B* 2013, 1, 3369-3379.

Meyer, K. Chemical structure of hyaluronic acid. *Federation Proceedings* 1958, 17, 1075-1077.

Mitra, A.; Dey, B. Chitosan microspheres in novel drug delivery systems. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011, 73, 355-366.

Moore, J. W.; Flanner, H. H. Mathematical comparison of dissolution profiles. *Pharmaceutical Technology* 1996, 20, 64-74.

Nair, L. S. and Laurencin, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* 2007, 32, 762-798.

Neto, C.; Dantas, T.; Fonseca, J.; Pereira, M. Permeability studies in chitosan membranes. Effects of crosslinking and poly(ethylene oxide) addition. *Carbohydrate Research* 2005, 340, 2630-2636.

Niknejad, H.; Mahmoudzadeh, R. Comparison of different crosslinking methods for preparation of docetaxel-loaded albumin nanoparticles. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2015, 14, 385-394.

Nishida, H.; Yamashita, M.; Nagashima, M.; Hattori, N.; Endo, T.; Tokiwa, Y. Theoretical prediction of molecular weight on autocatalytic random hydrolysis of aliphatic polyesters. *Macromolecules* 2000, 33, 6595-6601.

Ofokansi, K. C.; Kenechukwu, F. C.; Isah, A. B.; Okigbo, E. L. Formulation and evaluation of glutaraldehyde-crosslinked chitosan microparticles for the delivery of ibuprofen. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2013, 12, 19-25.

Oh, J. K.; Drumright, R.; Siegwart, D. J.; Matyjaszewski, K. The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Progress in Polymer Science* 2008, 33, 448-477.

Oh, J. K.; Lee, D. I.; Park, J. M.. Biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery applications. *Progress in Polymer Science* 2009, 34, 1261-1282.

Park, T. G. Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition. *Biomaterials* 1995, 16, 1123–1130.

Park, T.G. Degradation of poly(d,l-lactic acid) microspheres: Effect of molecular weight. *Journal of Controlled Release* 1994, 30, 161-173.

Patel, K. S.; Patel, M. B. Preparation and evaluation of chitosan microspheres containing nicorandil. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* 2014, 4, 32-37.

Pays, K.; Giermanska-Kahn, J.; Pouligny, B.; Bibette, J.; Leal-Calderon, F. Double emulsions: how does release occur?. *Journal of Controlled Release* 2002, 79, 193-205.

Phromsopha, T.; Baimark, Y. Chitosan microparticles prepared by the water-in-oil emulsion solvent diffusion method for drug delivery. *Biotechnology* 2010, 9, 61-66.

Pillai, C. K. S. and Sharma, C. P. Review paper: absorbable polymeric surgical sutures: chemistry, production, properties, biodegradability, and performance. *Journal of Biomaterials Applications* 2010, 25, 291-366.

Pillay, V.; Fassihi, R. Evaluation and comparison of dissolution data derived from different modified release dosage forms: an alternative method. *Journal of Controlled Release* 1998, 55, 45–55.

Pitt, C. G.; Jeffcoat, A. R.; Zweidinger, R. A.; Schindler, A. Sustained drug delivery systems. I. The permeability of poly(ϵ -caprolactone), poly(DL-lactic acid), and their copolymers. *Journal of Biomedical Materials Research* 1979, 13, 497–507.

Qi, F.; Wu, J.; Fan, Q.; He, F.; Tian, G.; Yang, T.; Ma, G.; Su, Z. Preparation of uniform-sized exenatide-loaded PLGA microspheres as long-effective release system with high encapsulation efficiency and bio-stability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2013, 112, 492–498.

Raemdonck, K.; Naeye, B.; Buyens, K.; Vandenbroucke, R. E.; Høgset, A.; Demeester, J.; Smedt, S. C. D. Biodegradable dextran nanogels for RNA interference: focusing on endosomal escape and intracellular siRNA delivery. *Advanced Functional Materials* 2009, 19, 1406-1415.

Raman, C.; Berkland, C.; Kim, K.; Pack, D. W. Modeling small-molecule release from PLG microspheres: effects of polymer degradation and nonuniform drug distribution. *Journal of Controlled Release* 2005, 103, 149-158.

Rathbone, M. J. Delivering drugs to farmed animals using controlled release science and technology. *IeJSME* 2012, 6, 118-128.

Rathbone, M. J., Macmillan, K. L.; Inskeep, K.; Burggraaf, S.; Bunt, C. R. Fertility regulation in cattle. *Journal of Controlled Release* 1998, 54, 117-148.

Rathbone, M. J.; Brayden, D. Controlled release drug delivery in farmed animals: Commercial challenges and academic opportunities. *Current Drug Delivery* 2009, 6, 383-390.

Rathbone, M. J.; Burke C. R.; Ogle, C. R.; Bunt, C. R.; Burggraaf, S.; Macmillan K. L. Design and development of controlled release intravaginal drug delivery systems. Controlled release veterinary drug delivery: biological and pharmaceutical considerations; eds.: Rathbone M. J. and Gurny R. Elsevier B.V. 2000.

Rathbone, M. J.; Macmillan, K. L. Applications of controlled release science and technology: Progesterone. Controlled Release Newsletter 2004, 21, 8-9.

Rathbone; M. J.; Kinder, J. E.; Fike, K.; Kojima, F.; Clopton, D.; Ogle, C. R.; Bunt, C. R. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. Advanced Drug Delivery Reviews 2001, 50, 277-320.

Ré, M. I. Formulating drug delivery systems by spray drying. Drying Technology 2006, 24, 433-446.

Regnier-Delplace, C.; Thillaye du Boullay, O.; Siepmann, F.; Martin-Vaca, B.; Degrave, N.; Demonchaux, P.; Jentzer, O.; Bourissou, D.; Siepmann, J. PLGA microparticles with zero-order release of the labile anti-Parkinson drug apomorphine. International Journal of Pharmaceutics 2013, 443, 68-79.

Robinson, J. R.; Rathbone, M. J. Mucosal Drug Delivery - Rectal, Uterine and Vaginal. In: Encyclopaedia of Controlled Drug Delivery. Ed. E. Mathiowitz. John Wiley and Sons, Inc., New York, USA, 1999.

Roelofs, J.; López-Gatius, F.; Hunter, R. H. F.; van Eerdenburg, F. J.; Hanzen, C. When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. Theriogenology 2010, 74, 327–344.

Roelofs, J.B.; van Eerdenburg, F. J.; Soede, N. M.; Kemp, B. Various behavioral signs of estrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. Theriogenology 2005, 63, 1366–1377.

Rosilio, V.; Deyme, M.; Benoit, J. P.; Madelmont, G. Physical aging of progesterone loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. Pharmaceutical Research 1998, 15, 794-798.

Roy, S.; Panpalia, S. G.; Nandy, B. C.; Rai, V. K.; Tyagi, L. K.; Dey, S.; Meena, K. C. Effect of method of preparation on chitosan microspheres of mefenamic acid. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research 2009, 1, 36-42.

Sansdrap, P.; Moës, A. J. Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedipine from poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres. International Journal of Pharmaceutics 1993, 98, 157–164.

Sansdrap, P; Moës, A. J. In vitro evaluation of the hydrolytic degradation of dispersed and aggregated poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. Journal of Controlled Release 1997, 43, 47–58.

Saunders, B. R. On the Structure of poly(N-isopropylacrylamide) microgel particles. Langmuir 2004, 20, 3925-3932

Schliecker, G.; Schmidt, C.; Fuchs, S.; Kissel, T. Characterization of a homologous series of D,L-lactic acid oligomers: a mechanistic study on the degradation kinetics in vitro. *Biomaterials* 2003, 24, 3835–3844.

Schmitt, E. A.; Flanagan, D. R.; Linhardt, R. J. Degradation and release properties of pellets fabricated from 3 commercial poly (D,L-lactide-co-glycolide) biodegradable polymers. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1993, 82, 326–329.

Scipioni, R.; Foote, R. Short communication: An electronic probe versus milk progesterone as aids for reproductive management of small dairy herds. *Journal of Dairy Science* 1999, 82, 1742-1745.

Shah, R. K.; Shum, H. C.; Rowat, A. C.; Lee, D.; Agresti, J. J.; Utada, A. S.; Chu, L. Y.; Kim, J. W.; Fernandez-Nieves, A.; Martinez, C. J.; Weitz, D. A. Designer emulsions using microfluidics. *Materials Today* 2008, 11, 18-27.

Shaham-Albalancy, A.; Rosenberg, M.; Folman, Y.; Graber, Y.; Meidan, R. y Wolfenson, D. Two methods of inducing low plasma progesterone concentrations have different effects on dominant follicles in cows. *Journal of Dairy Science* 2000, 83, 2771-2778.

Shameem, M.; Lee, H. and DeLuca, P. P. A shortterm (accelerated release) approach to evaluate peptide release from PLGA depot formulations. *AAPS Journal* 1999, 1, 1-6.

Shearer, J. K. Reproductive anatomy and physiology of dairy cattle. Animal Science Department, Florida Cooperative Extension Service. University of Florida, 2003.

Shih, C. Chain-end scission in acid catalyzed hydrolysis of poly(D,L-lactide) in solution. *Journal of Controlled Release* 1995, 34, 9–15.

Shu, X. Z.; Zhu, K. J. Chitosan/gelatin microspheres prepared by modified emulsification and ionotropic gelation. *Journal of Microencapsulation* 2001, 18, 237-245.

Sieminska, L.; Ferguson, M.; Zerda, T. W.; Couch, E. Diffusion of steroids in porous sol-gel glass: Application in slow drug delivery. *Sol-Gel Science and Technology* 1997, 8, 1105-1109.

Siepmann, J.; Elkharraz, K.; Siepmann, F. and Klose, D. How autocatalysis accelerates drug release from PLGA-based microparticles: a quantitative treatment. *Biomacromolecules* 2005, 6, 2312-2319.

Siepmann, J.; Faisant, N.; Benoit, J. P. A new mathematical model quantifying drug release from bioerodible microparticles using Monte Carlo simulations. *Pharmaceutical Research* 2002, 19, 1885–1893.

Sinha, V. R.; Singla, A.K.; Wadhawan, S.; Kaushik, R.; Kumaria, R.; Bansal, K.; Dhawan, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 2004, 274, 1–33.

Siparsky, G.L.; Voorhees, K. J.; Miao, F. D. Hydrolysis of polylactic acid (PLA) and polycaprolactone (PCL) in aqueous acetonitrile solutions: autocatalysis. *Journal of Environmental Polymer Degradation* 1998, 6, 31–41.

Smeets, N. M. B.; Hoare, T. Designing responsive microgels for drug delivery applications. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 2013, 51, 3027–3043.

Soares, J. S.; Zunino, P. A mixture model for water uptake, degradation, erosion and drug release from polydisperse polymeric networks. *Biomaterials* 2010, 31, 3032–3042.

Sollohub, K.; Cal, K. Spray drying technique: II. Current applications in pharmaceutical technology. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010, 99, 587-597.

Srinidhi, M.; Manju gowda, M. R.; Jayanthi, C.; Srikanth, A. Coacervation method for preparation of curcumin micro particles using natural polymer casein. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2015, 4, 293-304.

Stulzer, H. K.; Tagliari, M. P.; Parize, A. L.; Silva, M. A. S.; Laranjeira, M. C. M. Evaluation of cross-linked chitosan microparticles containing acyclovir obtained by spray-drying, *Materials Science and Engineering: C* 2009, 29, 387-392.

Sun, Y.; Scruggs, D. W.; Peng, Y.; Johson, J. R.; Shukla, A. J. Issues and challenges in developing long-acting veterinary antibiotic formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004, 56, 1481-1496.

Swarbrick, J.; Boylan, J. Spray drying and spray congealing of pharmaceuticals. Marcel Dekker Inc., New York, 1992.

Tang, J.; Liu, Z.; Zhang, Y.; Wang, L.; Li, D.; Ding, J.; Jiang, X. Fluorofenidone-loaded PLGA microspheres for targeted treatment of paraquat-induced acute lung injury in rats. *RSC Advances* 2015, 5, 30153-30159.

Tao, Y.; Zhang, H. L.; Hu, Y. M.; Wan, S.; Su, Z. Q. Preparation of chitosan and water-soluble chitosan microspheres via spray-drying method to lower blood lipids in rats fed with high-fat diets. *International Journal of Molecular Sciences* 2013, 14, 4174-4184.

Thakkar, H. P.; Murthy, R. R. Effect of cross-linking agent on the characteristics of celecoxib loaded chitosan microspheres. *Asian Journal of Pharmaceutics* 2008, 2, 246–51.

Thakur, V. K.; Thakur, M. K. Handbook of polymers for pharmaceutical technologies. Volume 2: processing and applications. John Wiley & Sons 2015, Chapter 6, 151-172.

Thomasin, C.; Johansen, P.; Alder, R.; Bemsel, R.; Hottinger, G.; Altorfer, H.; Wright, A. D.; Wehrli, E.; Merkle, H. P.; Gander, B. A contribution to overcoming the problem of residual solvents in biodegradable microspheres prepared by coacervation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 1996, 42, 16– 24.

Tiwari, S.; Verma, P. Microencapsulation technique by solvent evaporation method (Study of effect of process variables). *International Journal of Pharmaceutical and Life Sciences* 2011, 2, 998-1005.

Turino, L. N. (2012). Desarrollo de sistemas inyectables biodegradables con formación in situ para la liberación sostenida de drogas veterinarias. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Turino, L. N.; Mariano, R. N.; Boimvaser, S.; Luna, J. A. In situ formed microparticles of PLGA from O/W emulsions stabilized with PVA: encapsulation and controlled release of progesterone. *Journal of Pharmaceutical Innovation* 2014, 9, 132 – 140.

Varde, N. K.; Pack, D. W. Microspheres for controlled release drug delivery. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2004, 4, 35–51.

Vey, E.; Roger, C.; Meehan, L.; Booth, J.; Claybourn, M.; Miller, A.; Saiani, A. Degradation mechanism of poly(lactic-co-glycolic) acid block copolymer cast films in phosphate buffer solution. *Polymer Degradation and Stability* 2008, 93, 1869-1876.

von Burkersroda, F.; Schedl, L.; Gopferich, A. Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials* 2002, 23, 4221– 4231.

Vrancken, M. N.; Claeys, D. A. Process for encapsulating water and compounds in aqueous phase by evaporation. US Patent 3523906, 1970a.

Vrancken, M. N.; Claeys, D. A. Process for encapsulating water and compounds in aqueous phase by extraction. US Patent 3523907, 1970b.

Wada, R.; Hyon, S.H.; Ikada, Y. Lactic acid oligomer microspheres containing hydrophilic drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1990, 79, 919–924.

Walke, S.; Srivastava, G.; Nikalje, M.; Doshi, J.; Kumar, R.; Ravetkar, S.; Doshi, P. Fabrication of chitosan microspheres using vanillin/TPP dual crosslinkers for protein antigens encapsulation. *Carbohydrate Polymers* 2015, 128, 188-198.

Wang, F. J.; Wang, C. H. Effects of fabrication conditions on the characteristic of etanidazole spray-dried microspheres. *Journal of Microencapsulation* 2002, 19, 495-510.

Wang, H. T.; Palmer, H.; Linhardt, R. J.; Flanagan, D. R.; Schmitt, E. Degradation of poly(ester) microspheres. *Biomaterials* 1990, 11, 679–685.

Wang, J.; Schwendeman, S. P. Mechanisms of solvent evaporation encapsulation processes: prediction of solvent evaporation rate. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1999, 88, 1090-1099.

Wang, N.; Qiu, J. S.; Wu, X. S. Tailored polymeric materials for controlled delivery systems, ACS Symposium Series 709, ed by Mc Culloch I and Shalaby SW. ACS, Washington DC, 242–254, 1998.

Wang, S.; Shi X.; Gan Z.; Wang, F. Preparation of PLGA microspheres with different porous morphologies. *Chinese Journal of Polymer Science* 2015, 33, 128-136.

Wang, Y.; Pan, J. Z.; Han, X. X.; Sinka, C.; Ding, L. F. A phenomenological model for the degradation of biodegradable polymers. *Biomaterials* 2008, 29, 3393–3401.

Weibel, M. I.; Badano, J. M.; Rintoul, I. Technological evolution of hormone delivery systems for estrous synchronization in cattle. *International Journal of Livestock Research* 2014, 4, 20-40.

Wiltbank, M. C.; Gümen, A. and Sartory, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Proc. Bovine Reproduction: Education and Discussion. Solutions for the Practicing Veterinarian* 2006, 93-125.

Winzenburg, G.; Schmidt, C.; Fuchs, S.; Kissel, T. Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004, 56, 1453–1466.

Wischke, C.; Schwendeman, S. P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 2008, 364, 298-327.

Wu, X. S. Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part III: drug delivery application. *Artificial Cells, Blood Substitute, and Biotechnology* 2004, 32, 575-591.

Wu, X. S.; Wang, N. Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: biodegradation. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* 2001, 12, 21–34.

Xu, Q.; Hashimoto, M.; Dang, T. T.; Hoare, T.; Kohane, D. S.; Whitesides, G. M.; Langer, R.; Anderson, D. G. Preparation of monodisperse biodegradable polymer microparticles using a microfluidic flow-focusing device for controlled drug delivery. *Small* 2009, 5, 1575-1581.

Yang, Q.; Owusu-Ababio, G. Biodegradable Progesterone Microsphere Delivery System for Osteoporosis Therapy. *Drug development and industrial pharmacy* 2000, 26, 61-70.

Zambaux, M. F.; Bonneaux, F.; Gref, R.; Maincent, P.; Dellacherie, E.; Alonso, M. J.; Labrude, P.; Vigneron, C. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *Journal of Controlled Release* 1998, 50, 31–40.

Zhu, J. H.; Shen, Z. R.; Wu, L. T.; Yang, S. L. In vitro degradation of polylactide and poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Applied Polymer Science* 1991, 43, 2099–2106.

Zilberman, M.; Grinberg, O. HRP-loaded bioresorbable microspheres: effect of copolymer composition and molecular weight on microstructure and release profile. *Journal of Biomaterials Applications* 2008, 1, 391-408.

Apéndices

Apéndice A: Modelo matemático de la degradación hidrolítica homogénea de microesferas de PLGA

A partir del Esquema 2.1 y teniendo en cuenta el efecto catalítico del medio ácido, se derivan los siguientes balances de masa:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \{ [P_n(l, g, c)] V \} = & -k_{L-L} l [P_n(l, g, c)] [H^+] V - k_{G-G} g [P_n(l, g, c)] [H^+] V - k_{L-G} c [P_n(l, g, c)] [H^+] V - f k_d [P_n(l, g, c)] 4\pi R^2 + \\ & + \sum_{m=n+1}^{\infty} \left(\sum_{k=l+1}^{\infty} k_{L-L} p_k k [P_m(k, g, c)] + \sum_{h=g+1}^{\infty} k_{G-G} p_h h [P_m(l, h, c)] + \sum_{d=c+1}^{\infty} k_{L-G} p_d d [P_m(l, g, d)] \right) V \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & n = 1, 2, 3, \dots \\ & f = 0 \text{ si } n > n_s \\ & f = 1 \text{ si } n < n_s \end{aligned} \quad \text{A.1}$$

donde p_i es la probabilidad de ruptura de una cadena con i enlaces éster; n_s es la longitud de cadena crítica para la disolución de oligómeros y k_d es la constante de velocidad de disolución de los oligómeros. Notar que la longitud de cadena n está relacionada con el número de enlaces éster de la siguiente manera: $n = l + g + c + 1$. La generación de especies de polímero por escisión de cadena se modela suponiendo una distribución de probabilidad de ruptura uniforme para cada tipo de enlace éster. Para las especies poliméricas con grupos ácidos es posible escribir el siguiente equilibrio de disociación global:



Considerando $[P^-] = [H^+]$, se deriva el siguiente balance de masa para la especie H^+ :

$$\frac{d}{dt} \{ [H^+] V \} = k_{a1} [P] V - k_{a2} [H^+]^2 V \quad \text{A.3}$$

donde $[P]$ es la concentración total de polímero, definida como:

$$[P] = \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n(l, g, c)] \quad \text{A.4}$$

A partir de las Ecs. A.1 se puede estimar la distribución de longitudes de cadena en número (NCLD) del copolímero:

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dt} \left(\sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n] V \right) = & -k_{L-L} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} l [P_n] [H^+] V - k_{G-G} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} g [P_n] [H^+] V - k_{L-G} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} c [P_n] [H^+] V - f k_d \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n] 4\pi R^2 + \\
& + \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} \left\{ \sum_{m=n+1}^{\infty} \left(\sum_{k=l+1}^{\infty} k_{L-L} p_k k [P_m(k, g, c)] + \sum_{h=g+1}^{\infty} k_{G-G} p_h h [P_m(l, h, c)] + \sum_{d=c+1}^{\infty} k_{L-G} p_d d [P_m(l, g, d)] \right) V \right\} \\
& n = 1, 2, 3, \dots \\
& l, g, c = 0, 1, 2, 3, \dots \\
& f = 0 \text{ si } n > n_s \\
& f = 1 \text{ si } n < n_s \quad \text{A.5}
\end{aligned}$$

Multiplicando las Ecs. A.5 por el peso molecular medio de la unidad repetitiva (M_{UR}), se puede calcular la distribución de longitud de cadena en peso (WCLD):

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dt} \left(\sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n] n M_{UR} V \right) = & \left\{ -k_{L-L} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} l [P_n] [H^+] V - k_{G-G} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} g [P_n] [H^+] V - k_{L-G} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} c [P_n] [H^+] V - f k_d \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n] 4\pi R^2 + \right. \\
& \left. + \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} \left[\sum_{m=n+1}^{\infty} \left(\sum_{k=l+1}^{\infty} k_{L-L} p_k k [P_m(k, g, c)] + \sum_{h=g+1}^{\infty} k_{G-G} p_h h [P_m(l, h, c)] + \sum_{d=c+1}^{\infty} k_{L-G} p_d d [P_m(l, g, d)] \right) V \right] n M_{UR} \right\} \\
& n = 1, 2, 3, \dots \\
& l, g, c = 0, 1, 2, 3, \dots \\
& f = 0 \text{ si } n > n_s \\
& f = 1 \text{ si } n < n_s \quad \text{A.6}
\end{aligned}$$

donde $M_{UR} = x_{L-L} M_{L-L} + x_{G-G} M_{G-G} + x_{L-G} M_{L-G}$. En esta ecuación, M_{L-L} , M_{G-G} and M_{L-G} son las masas molares de las correspondientes unidades repetitivas y x_{L-L} , x_{G-G} y x_{L-G} representan la fracción molar de enlaces éster L-L, G-G y L-G, definidas como:

$$x_{L-L} = \frac{[E_{L-L}]}{[E_{L-L}] + [E_{G-G}] + [E_{L-G}]} \quad \text{A.7}$$

$$x_{G-G} = \frac{[E_{G-G}]}{[E_{L-L}] + [E_{G-G}] + [E_{L-G}]} \quad \text{A.8}$$

$$x_{L-G} = \frac{[E_{L-G}]}{[E_{L-L}] + [E_{G-G}] + [E_{L-G}]} \quad \text{A.9}$$

Las concentraciones de los enlaces éster se calculan empleando las siguientes expresiones:

$$[E_{L-L}] = \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} l [P_n(l, g, c)] \quad \text{A.10}$$

$$[E_{G-G}] = \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} g [P_n(l, g, c)] \quad \text{A.11}$$

$$[E_{L-G}] = \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} c [P_n(l, g, c)] \quad \text{A.12}$$

Los pesos moleculares medios del copolímero se calculan de la siguiente manera:

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n(l, g, c)] n M_{UR}}{\sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n(l, g, c)]} \quad \text{A.13}$$

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n(l, g, c)] n^2 M_{UR}}{\sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n(l, g, c)] n} \quad \text{A.14}$$

La pérdida de masa se puede calcular a partir del siguiente balance de masa total que considera que la disolución de las especies de baja masa molar:

$$\frac{dM}{dt} = - \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n(l, g, c)] n M_{UR} k_d f 4\pi R^2 \quad \text{A.15}$$

donde M es la masa total de la partícula.

Apéndice B: Modelo matemático de la degradación hidrolítica heterogénea de microesferas de PLGA

A partir de las Ecs. 4-6, es posible derivar los siguientes balances de masa para cada especie P_n :

$$\begin{aligned} \frac{\partial \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n]}{\partial t} = & \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 D_{P_n} \frac{\partial \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n]}{\partial r} \right) - k_{L-L} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} l [P_n] [H^+] - k_{G-G} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} g [P_n] [H^+] - k_{L-G} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} c [P_n] [H^+] + \\ & + \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} \left\{ \sum_{m=n+1}^{\infty} \left(\sum_{k=l+1}^{\infty} k_{L-L} p_k k [P_m(k, g, c)] + \sum_{h=g+1}^{\infty} k_{G-G} p_h h [P_m(l, h, c)] + \sum_{d=c+1}^{\infty} k_{L-G} p_d d [P_m(l, g, d)] \right) \right\} \\ & n = 1, 2, 3, \dots \\ & n < n_s \quad \text{B.1} \end{aligned}$$

donde n_s es la longitud de cadena crítica para la disolución de los oligómeros, D_{P_n} es la difusividad efectiva de las cadenas poliméricas P_n y r es la posición radial dentro de una microesfera. Notar que la longitud de cadena n está relacionada con el número de enlaces éster de la siguiente manera: $n = l + g + c + 1$.

Considerando $[P] = [H^+]$, se obtiene el siguiente balance de masa para los protones:

$$\frac{d[H^+]}{dt} = k_{a_1} [P] - k_{a_2} [H^+]^2 \quad \text{B.2}$$

donde $[P]$ es la concentración total de polímero, definida como:

$$[P] = \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n(l, g, c)] \quad \text{B.3}$$

Con respecto a las condiciones de borde, se aplica la condición de simetría para la concentración de oligómeros en el centro de la micropartícula:

$$\left. \frac{\partial [P_n]}{\partial r} \right|_{r=0} = 0 \quad n < n_s \quad \text{B.4}$$

En la interfase micropartícula-medio acuoso, se considera “sink conditions” (Ec. B.5).

$$[P_n] \Big|_{r=R} = 0 \quad n < n_s \quad \text{B.5}$$

El incremento de la difusividad durante la degradación está relacionado con la evolución del peso molecular medio en peso a través de la siguiente expresión (Ford y col., 2011):

$$D_{P_n} = D_{P_n}^0 \left[1 + \left(1 - \frac{\overline{M}_w(t, r)}{\overline{M}_w(t=0)} \right) (k_D - 1) \right] \quad n < n_s \quad \text{B.6}$$

donde $D_{P_n}^0$ es la difusividad inicial de las cadenas poliméricas, \overline{M}_w es el peso molecular promedio en peso del polímero y k_D es un parámetro de ajuste relacionado a las difusividades efectivas de las especies poliméricas en solución acuosa y en el sólido. Esta ecuación permite acoplar la evolución de la porosidad de la partícula a la difusividad efectiva.

A partir de las Ecs. B.1, se puede estimar la distribución de longitud de cadena en número (DLCN) del copolímero:

$$x_n = \frac{\int_0^R [P_n(l, g, c)] r^2 dr}{\int_0^R \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n(l, g, c)] r^2 dr} \quad \text{B.7}$$

Multiplicando las Ecs. B.7 por el peso molecular promedio de la unidad repetitiva (M_{UR}), se puede calcular la distribución de longitud de cadena en peso (DLCP):

$$x_w = \frac{\int_0^R [P_n(l, g, c)] n M_{UR} r^2 dr}{\int_0^R \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n(l, g, c)] n M_{UR} r^2 dr} \quad \text{B.8}$$

donde $M_{UR} = x_{L-L} M_{L-L} + x_{G-G} M_{G-G} + x_{L-G} M_{L-G}$. En esta ecuación, M_{L-L} , M_{G-G} y M_{L-G} son las masas molares correspondientes de las unidades repetitivas y x_{L-L} , x_{G-G} y x_{L-G} representan la fracción molar de los enlaces éster L-L, G-G y L-G, dada por:

$$x_{L-L} = \frac{[E_{L-L}]}{[E_{L-L}] + [E_{G-G}] + [E_{L-G}]} \quad \text{B.9}$$

$$x_{G-G} = \frac{[E_{G-G}]}{[E_{L-L}] + [E_{G-G}] + [E_{L-G}]} \quad \text{B.10}$$

$$x_{L-G} = \frac{[E_{L-G}]}{[E_{L-L}] + [E_{G-G}] + [E_{L-G}]} \quad \text{B.11}$$

Los pesos moleculares medios del copolímero se calculan a partir de las siguientes expresiones:

$$\overline{M}_n = \frac{\int_0^R \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n(l, g, c)] n M_{UR} r^2 dr}{\int_0^R \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n(l, g, c)] r^2 dr} \quad \text{B.12}$$

$$\overline{M}_w = \frac{\int_0^R \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n(l, g, c)] (n M_{UR})^2 r^2 dr}{\int_0^R \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n(l, g, c)] n M_{UR} r^2 dr} \quad \text{B.13}$$